



Etude de l'efficacité de la fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA après hydrolyse acide et dans différentes matrices minérales analogues martiennes : application aux expériences Sample Analysis at Mars (SAM) et Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA)

Amaury Brault

► To cite this version:

Amaury Brault. Etude de l'efficacité de la fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA après hydrolyse acide et dans différentes matrices minérales analogues martiennes : application aux expériences Sample Analysis at Mars (SAM) et Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA). Autre. Ecole Centrale Paris, 2015. Français. NNT : 2015ECAP0045 . tel-01316877

HAL Id: tel-01316877

<https://theses.hal.science/tel-01316877>

Submitted on 17 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



CentraleSupélec

THÈSE
présentée par

Amaury BRAULT

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR

Spécialité : Exobiologie – Chimie analytique

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM)

SUJET :

Etude de l'efficacité de la fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA après hydrolyse acide et dans différentes matrices minérales analogues martiennes. Application aux expériences Sample Analysis at Mars (SAM) et Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA).

soutenue le : 25 septembre 2015

devant un jury composé de :

**Frances WESTALL
Uwe MEIERHENRICH
Cyril SZOPA
Caroline FREISSINET
Arnaud BUCH
Moncef STAMBOULI**

**Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur
Directeur**

Remerciements

L'aboutissement de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de multiples personnes, qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à la réalisation de ce doctorat.

Je tiens premièrement à remercier mes encadrants Arnaud Buch et Moncef Stambouli, qui, grâce à leurs connaissances, leur patience et leur pédagogie, ont su m'accompagner tout au long de ma thèse.

Je suis également reconnaissant envers Cyril Szopa et Caroline Freissinet, qui ont accepté d'être examinateurs au sein de mon jury de thèse, ainsi que Uwe Meierhenrich et Frances Westall, qui ont accepté d'en être les rapporteurs.

J'aimerais également remercier l'ensemble des personnes qui ont pu m'apporter leur aide dans l'acquisition et l'interprétation des résultats présentés dans cette thèse : Carole Garnier, Caroline Freissinet, Jing He, Imène Belmahdi, Fabien Stalport, Daniel Glavin, Coralie Brassé, Pin Lu, Barbara Malinowska, Gilles Boemare, et Dominique Chevalier.

Je tiens de plus à remercier l'ensemble du LGPM pour son accueil chaleureux, notamment Corinne Roussel, Jamila El Bekri, Jean Trubuil, Annie Boemare, Mathilde Charters, Cyril Breton, Hélène Santigny, Vincent Butin, Carole Bernard et Catherine Kruch pour leur aide régulière au laboratoire.

Je tiens d'autre part à remercier Patrice Coll, qui a su m'orienter vers ce sujet de thèse, Michel Viso pour nos échanges intéressants, Michel Dobrijevic pour son orientation, Kafila Saiagh, Sofien Cavagnol, Pascal Buizard et Zhaohuan Mai pour leur soutien et leur amitié, ainsi que toutes les personnes rencontrées au cours de cette thèse, notamment au sein de l'Ecole Centrale Paris, lors du COSPAR 2012, et aux Rencontres Exobiologiques pour Doctorants 2012.

Je tiens également à remercier le personnel de l'école doctorale SMEMaG, notamment Catherine Lhopital, Emmanuelle Coplo et Géraldine Carbonel pour leur amabilité ; ainsi que Benoit Goyeau, directeur de l'école doctorale, pour son soutien et ses conseils précieux.

Je tiens finalement à remercier ma famille et mes proches, notamment Sophia Salhi, mes parents Jean-Michel et Fabienne, mes frères Michel et Adrien, ma sœur Emmanuelle, et mes amis, qui ont toujours su m'apporter leur soutien, quelles que soient les circonstances.

Sommaire

Introduction Générale	1
Glossaire	5
Chapitre I : Bibliographie	7
1.1) Introduction	7
1.1.1) Qu'est-ce que la vie ?.....	8
1.1.2) Comment la vie telle qu'on la connaît est-elle apparue ?.....	10
1.1.3) Pourquoi chercher la vie ailleurs? Intérêt de Mars et des météorites.....	13
1.1.4) Conclusion.....	15
1.2) Que chercher : bioindices et biomarqueurs	15
1.2.1) Signatures morphologiques, sédimentaires et minérales.....	17
1.2.1.1) Signatures morphologiques	17
1.2.1.2) Structures sédimentaires d'origine microbienne	17
1.2.1.3) Biominéralisation	18
1.2.2) Signatures isotopiques.....	18
1.2.3) Signatures métaboliques	19
1.2.4) Présence de biopolymères, leurs monomères, et autres molécules organiques ..	23
1.2.4.1) Biomarqueurs.....	24
1.2.4.1.1) Biopolymères.....	24
<i>Acides nucléiques</i>	<i>24</i>
<i>Protéines</i>	<i>25</i>
<i>Polysaccharides et autres osides.....</i>	<i>25</i>
1.2.4.2) Lipides.....	27
1.2.4.2) Bioindices	27

1.2.4.2.1) Monomères	28
<i>Bases azotées</i>	28
<i>Acides aminés et chiralité</i>	29
<i>Oses et chiralité</i>	33
1.2.4.2.2) Acides carboxyliques	33
1.2.4.3) Matière organique complexe	34
1.2.5) Conclusion	35
1.3) Où chercher : du milieu interstellaire au système solaire interne	35
1.3.1) Le milieu interstellaire et les milieux circumstellaires	36
1.3.1.1) Observations	36
1.3.1.2) Simulations	37
1.3.2) Satellites de géantes gazeuses	39
1.3.2.1) Titan	39
1.3.2.2) Europe	40
1.3.2.3) Autres satellites	41
1.3.3) Comètes	41
1.3.4) Poussières interplanétaires	44
1.3.5) Les météorites	45
1.3.6) Mars	47
1.3.6.1) Introduction	47
1.3.6.2) Chronologie des temps géologiques martiens	48
1.3.6.3) Géologie et minéralogie martienne	49
a) Dichotomie crustale	49
<i>Hauts plateaux du sud et silicates primaires</i>	50
<i>Basses plaines du nord et oxydes de fer</i>	54
b) L'eau et les minéraux produits par l'altération aqueuse	56

<i>Phyllosilicates et autres silicates hydratés</i>	60
<i>Sulfates</i>	69
<i>Carbonates</i>	72
<i>Chlorures</i>	75
c) Nature oxydative du sol martien	75
<i>Perchlorates</i>	76
<i>Peroxyde d'hydrogène</i>	77
d) Nouvelle chronologie des temps géologiques martiens.....	77
1.3.6.4) L'exobiologie martienne	81
a) Implications de l'histoire géologique martienne pour la recherche de traces de vie sur Mars	81
b) Histoire de l'exobiologie martienne.....	82
1.3.7) Conclusion.....	86
1.4) Comment chercher : les méthodes d'extraction, d'analyse et de fonctionnalisation	87
1.4.1) Les techniques d'extraction.....	87
1.4.1.1) Méthodes d'extraction avec solvant.....	88
a) Extraction solide – liquide	88
b) Extraction assistée par ultrasons.....	89
c) Extraction par eau sous-critique.....	89
d) Extraction par fluide supercritique (SFE).....	90
e) Extraction en phase solide.....	90
f) Micro-extraction en phase solide.....	91
1.4.1.2) Méthodes d'extraction sans solvant.....	91
a) Désorption/ionization laser	91
b) Pyrolyse et hydrolyse	92

c) Thermochemolyse	93
d) Thermodésorption / sublimation	93
1.4.1.3) Focus sur les météorites et l'hydrolyse acide	93
a) 1 ^{ère} étape : extraction à l'eau	95
b) 2 ^{ème} étape : hydrolyse acide	95
1.4.1.4) Conclusion	99
1.4.2) La méthode d'analyse	99
1.4.2.1) Chromatographie échangeuse d'ions (IEC)	100
1.4.2.2) Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM)	101
1.4.2.3) Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (GC-IRMS)	103
1.4.2.4) Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance avec Détection par Fluorescence (HPLC-FD)	104
1.4.2.5) Conclusion	105
1.4.3) La fonctionnalisation	106
1.4.3.1) Fonctionnalisation post-colonne	106
1.4.3.2) Fonctionnalisation pré-colonne	107
a) Introduction	107
b) Réactifs utilisés en HPLC-FD	108
c) Réactifs utilisés en CPG	109
<i>TFAA/Isopropanol et autres agents d'acylation/estérification</i>	110
<i>N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA)</i>	112
<i>Tetramethylammonium (TMAH)</i>	113
<i>N-méthyl-N-tert-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA)</i>	113
1.4.3.3) Conclusion	115

1.4.4) Conclusion.....	115
1.5) Problèmes liés aux protocoles d'extraction et de fonctionnalisation ...	116
1.5.1) Impact de l'hydrolyse acide en phase liquide sur la récupération des acides aminés.....	116
1.5.1.1) Introduction	116
1.5.1.2) La dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse acide	117
a) Le tryptophane et la cystéine	118
b) Les autres acides aminés	119
c) Problèmes généraux	122
d) La correction des pertes	123
1.5.1.3) Données quantitatives obtenues par le travail sur des standards	124
1.5.1.4) Implications concernant les acides aminés météoritiques.....	127
1.5.2) Impact de la minéralogie martienne sur la fonctionnalisation au MTBSTFA, minéralogies choisies et analogues utilisés	130
1.5.2.1) Impact de la minéralogie sur la fonctionnalisation au MTBSTFA :	130
1.5.2.2) Minéralogies choisies.....	132
1.5.2.3) Analogues utilisés.....	133
a) Atacama (sol oxydant)	134
b) Svalbard (minéral hydraté).....	135
c) Rio Tinto (sels hydratés)	136
1.5.3) Conclusion.....	136
1.6) Conclusion.....	137
1.7) Références	138
Chapitre II : Impact de l'hydrolyse acide sur le recouvrement des acides aminés. Application à l'extraction des acides aminés issus de météorites / sols analogues martiens	159

2.1) Introduction	159
2.2) Produits, matériels et méthodes	159
2.2.1) Produits.....	159
2.2.2) Fonctionnalisation au MTBSTFA dans du DMF	161
2.2.3) La séparation par chromatographie en phase gazeuse : optimisation	164
2.2.3.1) Théorie des plateaux, efficacité d'une colonne chromatographique et grandeurs de rétention	165
2.2.3.2) Théorie cinétique et équation de Van Deemter - Golay.....	167
2.2.3.3) Détermination de la vitesse optimale de la phase mobile	168
2.2.3.4) Séparation chromatographique et détection des acides aminés.....	169
2.2.4) La détection et l'identification par spectrométrie de masse	171
2.2.4.1) Le spectromètre de masse	171
2.2.4.2) Librairie de masses spectrales et informations structurales sur les dérivatifs	174
2.2.5) L'hydrolyse acide	178
2.2.5.1) Protocoles d'analyse de la solution de référence et de la solution hydrolysée	178
2.2.5.1.1) La référence.....	178
2.2.5.1.2) L'hydrolyse	179
a) Protocole n°1 : HCl 6M, 100°C, 24h	179
b) Protocole n°2 : HCl 6M, température ambiante, 0h (contact rapide avec une solution de HCl 6M).....	179
c) Protocole n°3 : HCl 6M, 100°C, 24h, avec addition de fluorovaline	180
2.2.5.2) Protocole de fonctionnalisation et d'injection	180
2.3) Résultats et interprétations	180
2.3.1) Analyse du chromatogramme de référence.....	181

2.3.2) Influence de la procédure d'hydrolyse sur les quantités d'acides aminés (protocole n°1)	187
2.3.3) Influence du chauffage pendant la procédure d'hydrolyse (protocole n°2).....	194
2.3.4) Résumé et comparaison des protocoles n°1 et 2	198
2.3.5) Influence des sels générés pendant l'hydrolyse (protocole n°3)	201
2.3.6) Comparaison de nos résultats avec les études précédentes	203
2.4) Discussion	204
2.4.1) Hypothèse n°1 : dégradation des acides aminés par hydrolyse.....	205
2.4.2) Hypothèse n°2 : autres facteurs	208
2.4.2.1) Réduction du rendement de la fonctionnalisation causée par la présence d'ions Cl^- lors de la fonctionnalisation	208
a) Mécanisme de la silylation au MTBSTFA.....	208
b) Mécanisme de la réduction du rendement de la fonctionnalisation par les ions Cl^-	211
c) Perspectives	214
2.4.2.2) Silylation incomplète des acides aminés ou production d'artéfacts	216
2.4.2.3) Pertes en acides aminés lors de l'étape d'évaporation	217
a) Pertes par ébullition / dégradation thermique	217
b) Formation de liaisons peptidiques lors de l'évaporation.....	217
2.4.2.4) Pertes liées à la présence de sels d'ammonium	219
2.5) Conclusion.....	219
2.6) Références	221
Chapitre III : Influence de la minéralogie sur la réaction de fonctionnalisation au MTBSTFA	224
3.1) Introduction	224

3.2) Matériel et produits	228
3.3) 1 ^{ère} partie : tests préliminaires	228
3.3.1) Protocoles	229
a) La référence.....	230
b) L'analogue de sol martien	230
c) Schéma récapitulatif.....	231
3.3.2) Résultats et discussion.....	231
3.2.2.1) Référence	232
3.2.2.2) Sol oxydant (Atacama)	234
3.2.2.3) Smectite (Svalbard)	237
3.2.2.4) Sulfates hydratés (Rio Tinto).....	241
3.3.3) Conclusion.....	243
3.4) 2 ^{ème} partie : caractérisation des analogues martiens.....	245
3.4.1) Analyse élémentaire	246
3.4.1.1) Matériel et méthodes	246
Analyse des éléments C, H, N et S	248
Analyse de l'élément O.....	250
3.4.1.2) Résultats et discussion	251
3.4.2) Thermogravimétrie couplée à la calorimétrie différentielle à balayage et à la spectrométrie de masse (TG-DSC-MS).....	254
3.4.2.1) Introduction	254
Les différents types d'eau du sol.....	256
3.4.2.2) Matériel et méthodes	259
Thermogravimétrie.....	259
Calorimétrie différentielle à balayage	267
<i>Définition de la DSC</i>	267

<i>Principe de la DSC</i>	268
<i>Instrumentation et fonctionnement</i>	268
<i>Combinaison avec la TG</i>	270
Spectrométrie de masse.....	272
3.4.2.3) Résultats et discussion	273
3.4.2.3.1) Atacama.....	273
<i>Etude de l'évolution de l'intensité des fragments détectés, en fonction du gradient de température</i>	274
<i>Etude des données TG et DSC, et corrélation avec les données obtenues par MS</i>	288
3.4.2.3.2) Svalbard	302
<i>Etude de l'évolution de l'intensité des fragments détectés, en fonction du gradient de température</i>	303
<i>Etude des données TG et DSC, et corrélation avec les données obtenues par MS</i>	314
3.4.2.3.3) Rio Tinto	325
<i>Etude de l'évolution de l'intensité des fragments détectés, en fonction du gradient de température</i>	326
<i>Etude des données TG et DSC, et corrélation avec les données obtenues par MS</i>	338
3.4.3) Conclusion.....	347
3.5) 3 ^{ème} partie : focus sur Rio Tinto	348
3.5.1) Introduction	348
3.5.2) Hypothèses, protocoles et résultats.....	349
3.5.2.0) Référence	349
3.5.2.1) Sol non dopé	349
3.5.2.1.1) Expérience 1 (sol chauffé, 10 min. @ 150°C)	350

<i>Hypothèse</i>	350
<i>Protocole</i>	350
<i>Résultats</i>	350
3.5.2.1.2) Expérience 2 (sol non chauffé, ratio MTBSTFA / sol augmenté).....	358
<i>Hypothèse</i>	358
<i>Protocole</i>	358
<i>Résultats</i>	358
3.5.2.1.3) Expérience 3 (sol chauffé, 15 min. @ 75°C)	361
<i>Hypothèse</i>	361
<i>Protocole</i>	362
<i>Résultats</i>	362
3.5.2.1.4) Conclusion et perspectives.....	366
3.5.2.2) Sol dopé.....	370
3.5.2.2.1) Expérience 4 (sol non chauffé, « SAM-like »).....	370
<i>Hypothèse</i>	370
<i>Protocole</i>	371
<i>Résultats</i>	372
3.5.2.2.2) Expérience 5 (sol non chauffé, ratio MTBSTFA / sol augmenté).....	375
<i>Hypothèse</i>	375
<i>Protocole</i>	375
<i>Résultats</i>	376
3.5.2.2.3) Conclusion	378
3.5.3) Tableau récapitulatif et conclusions.....	379
3.6) Limites de l'étude.....	386
3.7) Conclusion.....	386
3.8) Références	387

Conclusion générale	391
Annexe	394

Introduction Générale

Comment la vie est-elle apparue ? A-t-elle pu apparaître ailleurs ? Ces questions fascinent le genre humain depuis fort longtemps. Il y a de ça plusieurs millénaires, les philosophes Grecs se posaient déjà les questions de l'origine de la vie, ainsi que de celle de l'Univers. La progression des découvertes scientifiques a permis d'apporter beaucoup d'éléments de réponse au fil du temps, mais elles restent majoritairement irrésolues.

L'exobiologie tente de répondre à ces questions. C'est une science interdisciplinaire s'intéressant à l'étude de l'origine, mais aussi de l'évolution, de la distribution, et du devenir de la vie dans l'Univers. Elle recouvre l'étude de la chimie prébiotique, la recherche des origines de la vie sur Terre, étudie le potentiel des espèces terrestres à s'adapter aux conditions extrêmes, et la recherche d'environnements habitables dans et en dehors du système solaire. Selon André Brack, l'exobiologie « va de l'astronomie à la biologie en passant par l'astrophysique, la planétologie, la géologie, la géochimie, la paléontologie, la minéralogie, la chimie et la biochimie. » (source : www.exobiologie.fr).

Le seul exemple de vie dont nous disposons est celui de la vie sur Terre. Pour essayer de répondre à la question de l'origine de la vie sur Terre, nous cherchons, dans le passé de la Terre, des indices sur la façon dont la matière organique inerte a abouti à la vie. Malheureusement, l'histoire primitive de la Terre a été effacée par son activité géologique. Il faut donc se tourner vers les milieux possédant, ou ayant possédé, les caractéristiques nécessaires à l'apparition de la vie telle qu'on la connaît sur Terre. De tels milieux sont présents dans notre système solaire, et la planète Mars en représente un très bon exemple. Elle possédait, en effet, les mêmes conditions que la Terre à l'époque où l'on pense que la vie y est apparue (Arvidson *et al.*, 2014; Grotzinger *et al.*, 2014). Afin de répondre aux questionnements de l'exobiologie, une voie de réponse possible est d'aller chercher des indices d'une vie passée ou présente sur Mars. Le fait de trouver de telles traces de vie sur un autre corps du système solaire permettrait à la fois d'en apprendre plus sur l'origine de la vie sur notre planète, et de savoir que la vie a potentiellement pu apparaître ailleurs. On peut également chercher la cause de la présence de molécules prébiotiques sur Terre : synthèse

locale, ou apports exogènes ? De nos jours, l'hypothèse prévalente est celle d'un apport par les astéroïdes, les comètes et leurs fragments. D'où l'intérêt de lister les molécules organiques présentes dans les météorites tombées sur Terre.

Pour rechercher des traces de vie passée ou présente sur Mars plusieurs voies sont possibles. On peut observer Mars depuis la terre, envoyer des orbiteurs, des sondes et des rovers afin d'y explorer l'atmosphère et la surface, et enfin étudier les différents objets météoritiques provenant de cette planète. La recherche de molécules organiques dans les météorites se fait donc en laboratoire et, contrairement à l'analyse *in situ*, permet l'utilisation de techniques plus élaborées. Une méthode analytique largement utilisée, à la fois pour l'analyse *in situ* (par exemple Viking, Mars Science Laboratory [MSL]) et en laboratoire, est la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM). Le plus souvent, une étape préalable de fonctionnalisation chimique est nécessaire afin de pouvoir détecter les molécules organiques cibles réfractaires (tels que les acides aminés, bases azotées et acides carboxyliques).

Cependant, sur Mars, la matrice minérale peut interférer avec les réactions de fonctionnalisation. Il est donc important de réaliser des tests en laboratoire sur des analogues de sols martiens, afin d'étudier la manière dont différentes matrices affectent les rendements de fonctionnalisation des molécules cibles. Cela afin de mieux prévoir l'efficacité de la réaction de fonctionnalisation utilisée *in situ* et ainsi de mieux interpréter les résultats obtenus lors de missions telles que MSL et la future mission ExoMars.

Sur les météorites, certaines molécules organiques d'intérêt exobiologique sont détectées après une extraction à l'eau et une hydrolyse acide des échantillons. Cependant, l'étape d'hydrolyse acide pourrait s'avérer destructive, et les sels présents après ces étapes peuvent également interférer avec la réaction de fonctionnalisation. Il est donc utile de s'intéresser à ces étapes d'extraction et d'évaluer l'impact de l'hydrolyse sur une possible dégradation des acides aminés, ainsi que sur une possible réduction du rendement de leur fonctionnalisation.

La problématique de cette thèse est donc de participer à l'amélioration des techniques permettant de rechercher des molécules organiques dans des milieux extraterrestres, y compris le matériel extraterrestre tombé sur Terre.

La première partie de la thèse a constitué en l'étude de l'influence du protocole d'hydrolyse par de l'acide chlorhydrique à 6 mol.L⁻¹ (HCl 6M) en phase liquide sur le recouvrement des acides aminés fonctionnalisés au *N*-méthyl-*N*-*tert*-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA). Les acides aminés ont été choisis car ce sont des indices de choix d'une vie passée ou présente. Ils font en effet partie des molécules recherchées sur Mars par les missions utilisant de la CPG-SM. On les trouve de plus dans les chondrites carbonées. Ce type de protocole d'hydrolyse acide est utilisé depuis le début des années 1970 sur les météorites.

La deuxième partie de la thèse a consisté à étudier l'influence de la minéralogie de différents analogues de sol martien sur l'efficacité de la réaction de fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA. Le MTBSTFA a été choisi car il est notamment utilisé sur l'expérience « Sample Analysis at Mars » (SAM). Un travail bibliographique a été réalisé afin de choisir plusieurs analogues représentatifs de la minéralogie martienne tout en tenant compte de la pertinence de ces minéralogies dans la recherche de molécules organiques sur Mars. Les analogues ont tout d'abord été caractérisés par analyse élémentaire, puis par thermogravimétrie couplée à la calorimétrie différentielle à balayage et à la spectrométrie de masse (TG-DSC-MS). Ensuite, l'influence de la nature de la matrice minéralogique sur l'efficacité de la réaction de fonctionnalisation des acides aminés a été étudiée. Les résultats obtenus ont permis d'identifier un type de minéralogie inhibant la réaction de fonctionnalisation : la présence de sulfates hydratés, mis en évidence par l'analyse d'un échantillon de sol de Rio Tinto. L'étude a ensuite été poursuivie afin de trouver des solutions compatibles avec l'exploration *in situ* de tels sols.

Les deux parties expérimentales de cette thèse ont permis d'une part de mettre en évidence une réduction des quantités d'acides aminés après hydrolyse acide, possiblement causée par la dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse, ou par la présence d'espèces chimiques telles que des sels lors de la fonctionnalisation ; et d'autre part de mettre en évidence une réduction du rendement de la fonctionnalisation au MTBSTFA causée par la présence d'eau lors de la fonctionnalisation sur analogue de sol martien. Il est donc nécessaire comprendre le mécanisme responsable de la réduction des quantités d'acides aminés dans le cas de l'hydrolyse acide au HCl 6M ; et de développer et d'utiliser des protocoles permettant de maximiser le rendement de la fonctionnalisation, en évitant la réaction du MTBSTFA avec des espèces autres que les espèces cibles. Cela peut notamment se faire, dans le cas des sols

et analogues martiens, par un pré-traitement de la matrice minérale pour en éliminer l'eau non-structurale, ou une augmentation du ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol.

Glossaire

Ala : L-Alanine

Arg : L-Arginine

Asp : Acide L-Aspartique

CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

Cys ou Cys₂ : L-Cystine

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DRX : Diffractométrie à Rayons X

Gly : Glycine

Glu : Acide L-Glutamique

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HCl : Acide chlorhydrique

HEPT : Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique

His : L-Histidine

Ile : Isoleucine

Leu : L-leucine

Lys : L-Lysine

Met : L-Méthionine

MIS : Milieu interstellaire

MOI : Matière Organique Insoluble

MOMA : Mars Organic Molecule Analyzer

MR : Mass Range

MSL : Mars Science Laboratory

MTBSTFA : *N*-méthyl-*N*-*tert*-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide

m/z : rapport de la masse d'un ion sur sa charge

NIST : National Institute of Standards and Technology

Phe : L-Phénylalanine

Pro : L-Proline

R/S: ratio de la quantité de réactif (MTBSTFA) sur la quantité de sol

SAM : Sample Analysis at Mars

Ser : L-Sérine

S_N2 : Substitution Nucléophile de type 2

tBDMS : *tert*-ButylDiMéthylSilyle

TG-DSC-MS : Thermogravimetry coupled to Differential Scanning Calorimetry and Mass Spectrometry (thermogravimétrie couplée à la calorimétrie différentielle à balayage et à la spectrométrie de masse)

TIC : Total Ion Count

Thr : L-Thréonine

TMS : TriMéthylSilyle

Tyr : L-Tyrosine

Val : L-Valine

xM : x moles par litres (mol.L⁻¹)

Chapitre I : Bibliographie

1.1) Introduction

Les questions de l'origine de la vie sur Terre et de la possibilité d'une vie ailleurs ne sont pas nouvelles. Au VI^{ème} siècle avant Jésus-Christ, les « philosophes de la nature », initiés à la science babylonienne et égyptienne, sont les premiers à proposer une explication rationnelle et systématique du monde. « L'eau est le principe de toutes choses », affirme Thalès (v. 625-v.547 av. J.-C.), premier à identifier un principe unique, l'humidité élémentaire dont dérivent toutes choses. Successeur de Thalès, Anaximandre (v. 610-v. 547 av. J.C.) remplace l'eau en tant que principe de l'Univers par l'« illimité » ou « apeiron ». Il pose qu'il existe des mondes illimités et que chacun de ces mondes naît de cet élément illimité. Anaximandre spéculait à propos des origines de la vie animale. Prenant en compte l'existence des fossiles, il avance que les premiers animaux, ancêtres des humains, ressemblant à des poissons, ont été créés à partir de terre et d'eau réchauffée. Ensuite, alors que l'humidité s'évapore, des terres sèches émergent, et sont colonisées par ces animaux capables d'adaptation. Bien qu'il n'ait formulé aucune idée à propos de sélection naturelle, certains considèrent Anaximandre comme le plus ancien partisan de la théorie de l'évolution. Anaximène (v. 585-v. 525 av. J.C.), élève d'Anaximandre, pense que l'air est à l'origine de tout. Il propose l'idée d'une soupe terrestre primordiale, une mixture de terre et d'eau, qui une fois combinée à la chaleur du soleil, produit directement les plantes, les animaux et les êtres humains. Tandis que les écoles philosophiques fleurissent, les atomistes abordent le monde par la matière, constituée d'atomes qui se font et se défont. Le coup de force des atomistes est d'affirmer que le vide existe : l'Univers est constitué de plein et de vide, d'être et de non-être. C'est de l'Univers que se forment les mondes, et c'est à lui qu'aboutit leur dissolution : notre Terre n'est qu'un monde parmi une infinité de mondes, qui naissent, vivent et meurent. Démocrite (v. 460-v.370 av. J.C.) soutient que la Terre est ronde, et déclare qu'originellement, l'Univers n'était composé de rien d'autre que de minuscules atomes s'agitant de manière chaotique, jusqu'à ce qu'ils entrent en collision pour former de plus grands éléments, dont la Terre et tout ce qu'il y a dessus. Il en déduit qu'il existe de nombreux mondes, certains

croissant, d'autres en ruines, certains avec ni soleils ni lunes, d'autres avec. Anaximandre – tout comme les atomistes Leucippe et Démocrite, et plus tard Epicure – avait lui aussi déjà spéculé sur la pluralité des mondes. Bien plus tard, au XVI^e siècle, Copernic place le Soleil au centre de l'univers, la Terre devenant une planète tournant autour de ce point fixe ; c'est la révolution de l'héliocentrisme. Giordano Bruno va plus loin en postulant que l'Univers, infini, abrite de multiples mondes. Selon lui, l'Homme, emporté dans le changement perpétuel du monde, a sans doute des comparses extraterrestres, et a tout lieu de s'en réjouir.

1.1.1) Qu'est-ce que la vie ?

Afin de comprendre l'origine de la vie sur Terre et de la rechercher ailleurs, il paraît nécessaire de la définir. Cependant, il est difficile d'obtenir une définition fixe du vivant. Pourtant, de notre point de vue, il existe une frontière nette et intuitive entre ce que l'on peut qualifier de vivant et de non-vivant. Mais cette capacité à différencier le vivant du non-vivant ne nous permet pas d'avoir une définition universelle de la vie, et soulève d'autres questions, telles que : où se situe la frontière entre vivant et non-vivant ? Est-il possible de créer une vie artificielle ?

A la lumière des découvertes récentes, il n'existe toujours pas de définition fixe et sans équivoque du vivant, et les débats existent toujours. Cependant, la vie peut être définie comme l'ensemble des propriétés, communes à tous les êtres vivants, qui les différencient des systèmes non-vivants. Il existe un ensemble de critères qui permettent de conclure sur la nature vivante ou non-vivante d'un système. On peut trouver de nombreuses listes de ces caractéristiques, variant selon les auteurs (Koshland Jr., 2002), mais les mêmes caractéristiques sont souvent retrouvées. Ainsi, un système pourra être qualifié de vivant s'il rassemble la plupart des caractéristiques suivantes :

1) L'**homéostasie** : la régulation de l'environnement interne pour maintenir un état constant, *e.g.* les concentrations en électrolytes ou la transpiration pour réduire la température ;

2) L'**organisation** : être constitué d'une ou plusieurs cellules, l'unité de base du vivant. Les cellules modernes elles-mêmes sont organisées en organites.

3) Le **métabolisme** : la transformation d'énergie en décomposant de la matière organique (le catabolisme), *e.g.* la respiration cellulaire ; et en utilisant l'énergie pour construire les composants des cellules (l'anabolisme), *e.g.* les protéines ou les acides nucléiques ; et par extension les **échanges** nécessaires avec le milieu extérieur (nutrition et excrétion) ;

4) La **croissance**, *i.e.* le maintien d'un taux d'anabolisme supérieur au catabolisme. Un organisme en croissance augmente la taille de l'ensemble de ses composants, plutôt que de simplement accumuler de la matière ;

5) L'**adaptation** : les individus les plus adaptés à leur environnement ont plus de chances de transmettre leurs gènes (*i.e.* une fitness plus élevée), autrement dit : un système vivant est capable d'évolution biologique, de génération en génération, par sélection naturelle des individus possédant les mutations les plus avantageuses au sein de leur environnement. L'information génétique est codée sous forme d'acide ribonucléique ou désoxyribonucléique (ARN ou ADN) ;

6) La **réponse** aux stimuli : les systèmes vivants répondent aux changements de leur environnement. La réponse se fait souvent sous la forme d'un mouvement. Par exemple, une plante poussant vers la source lumineuse (le phototropisme), les poils d'un mammifère se dressant sur en réponse à une baisse de température (l'horripilation) ;

7) La **reproduction** : la capacité de produire de nouveaux individus, soit de manière asexuée à partir d'un seul organisme parent, soit de manière sexuée à partir de deux organismes parents.

Créer une liste de caractéristiques permet de se rapprocher d'une définition, mais il subsiste des exemples qui posent problèmes, comme les virus, qui possèdent des gènes, évoluent par sélection naturelle, et se répliquent en produisant de nombreuses copies d'eux-mêmes. Cependant, ils ne possèdent pas de métabolisme, et ont besoin d'une cellule-hôte pour créer de nouvelles copies. On les considère comme étant à la limite du vivant. Le même cas se présente pour les prions, qui ne possèdent qu'une seule des caractéristiques : la reproduction.

Pour résumer, la plupart des êtres vivants possèdent des fonctions essentielles et communes, et on pourrait résumer la vie comme un système chimique auto-régulé et auto-organisé, capable d'échanges avec l'extérieur, de croissance, de réponse aux stimuli, et soumis à l'évolution Darwinienne grâce à sa capacité de reproduction. Certains l'ont définie comme « un système sous l'influence de la reproduction, la mutation et la sélection naturelle » (McKay, 1991); ou encore comme « un système chimique indépendant capable d'évolution Darwinienne » (définition officielle de la NASA, Gerald Joyce).

Afin de faciliter la recherche et l'identification de traces de vie en dehors de la Terre, il est également intéressant de s'interroger sur l'origine de la vie sur Terre.

1.1.2) Comment la vie telle qu'on la connaît est-elle apparue ?

Se poser la question de l'origine de la vie revient à s'interroger à propos de l'évolution chimique qui a conduit du non-vivant au vivant, et donc à se demander comment des molécules interagissant et réagissant entre elles ont pu acquérir les caractéristiques d'un système vivant.

La terre s'est formée il y a environ 4,54 milliard d'années (Ga) (Dalrymple, 2001). On estime que la vie telle qu'on la connaît pourrait être apparue sur Terre il y a environ 3,90 - 3,85 Ga (Lal, 2008). Les plus vieilles traces fossiles attribuées à des êtres vivants remontent à 3,49 Ga (Wacey *et al.*, 2011), voire 3,5 Ga (Schopf *et al.*, 2002), ou 3,86 Ga (Mojzsis *et al.*, 1996) (certaines de ces traces sont controversées).

Les hypothèses concernant l'origine de la vie remontent à l'antiquité et ont beaucoup évolué pour arriver aux théories modernes.

L'abiogénèse, ou biopoièse, est le processus par lequel la vie apparaît à partir de matière non-vivante, par opposition à la biogénèse, qui est la création d'organismes vivants à partir d'autres organismes vivants. Les origines de la vie (c'est à dire l'abiogénèse) sur Terre

demeurent incertaines. Il existe de nombreuses théories scientifiques qui tentent d'expliquer l'apparition de la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui.

Jusqu'à il y a quelques siècles, il était raisonnable de penser que l'abiogenèse se produisait tout autour de nous, que de nombreux êtres vivants apparaissaient à partir de matière non-vivante, de manière spontanée. Par exemple, les grenouilles semblaient apparaître dans la boue, les souris dans les tas de tissus, et les asticots dans la viande. C'est ce qu'on connaît sous le nom de « génération spontanée ». En Grèce antique, cette idée était soutenue notamment par Aristote, qui réalisa l'inventaire et poursuivi le travail de certains de ses prédécesseurs (Saint-Hilaire, 1883). Cette idée resta populaire jusqu'au Moyen Âge. Cependant, par la suite, la théorie de la génération spontanée fut graduellement discréditée par le travail de scientifiques tels que Sir Thomas Browne ou Francesco Redi, jusqu'à être fortement remise en question par le travail de Louis Pasteur. En 1871, Charles Darwin suggéra dans une lettre à Joseph Dalton Hooker que la vie était « apparue dans un petit étang chaud, avec toutes sortes de sels d'ammoniac et phosphoriques, de lumières, de chaleur, d'électricité, etc. en présence, de manière à ce qu'une protéine soit formée de manière chimique et prête à subir de plus complexes changements ».

Dans les années 1920, Oparine en Russie et Haldane en Angleterre suggèrent que la présence d'oxygène dans l'atmosphère primitive aurait pu empêcher la série d'événements qui aurait pu mener à l'apparition de la vie. Selon Oparine, une « soupe primordiale » de molécules organiques pourrait être créée dans une atmosphère dépourvue d'oxygène, grâce à l'action du soleil. Ainsi, Oparine et Haldane proposent une atmosphère primordiale semblable à celle des planètes Joviennes, contenant peu ou pas du tout d'oxygène (O_2), riche en hydrogène (H_2) et autres composés comme le méthane (CH_4) et l'ammoniaque (NH_3).

Inspirés par les idées de Darwin, Oparine et Haldane, Miller et Urey réalisent une expérience en 1953 (Miller, 1953). Ils simulent l'atmosphère de la Terre primitive grâce à un mélange gazeux de méthane, dihydrogène, ammoniaque et eau, c'est-à-dire une atmosphère réductrice (dépourvue d'oxygène). En soumettant le mélange à des décharges électriques, simulant les éclairs traversant l'atmosphère primitive de la Terre, ils observent la formation d'acides aminés, les blocs constitutifs des protéines, ainsi que d'autres molécules organiques,

comme des purines et pyrimidines, dont les bases des acides nucléiques font partie. Cela suggère que ces composants basiques de la vie peuvent se former spontanément, et auraient pu être présents en abondance sur la Terre primitive. Il a également été estimé plus tard que seul dans une atmosphère réductrice telle que celle utilisée par Miller et Urey en 1953, la synthèse de molécules organiques – incluant aussi des sucres et des bases organiques, les blocs constitutifs des nucléotides – aurait pu être possible en grandes quantités (Chyba and Sagan, 1992).

La validité du modèle de l'atmosphère primitive réductrice a plus tard été remise en question (Abelson, 1966). Depuis les années 1970, les atmosphères neutres sont préférées (Walker, 1977). Il a été montré que la production d'acides aminés et d'autres molécules organiques était bien moins efficace dans des atmosphères de ce type (Stribling and Miller, 1987). Cependant, des études plus récentes ont montré que l'atmosphère pourrait finalement avoir été réductrice (Schaefer and Fegley Jr., 2007; Tian *et al.*, 2005). De plus, même si l'atmosphère primitive fut neutre plutôt que réductrice, la synthèse d'acides aminés aurait pu être possible (Cleaves *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008).

Dans le cas où la synthèse d'acides aminés n'est pas aussi importante que prévue par l'expérience de Miller et Urey, les apports exogènes et/ou d'autres types de synthèse endogène (par exemple au niveau des sources hydrothermales au fond des océans) deviennent prépondérantes.

Cependant, la synthèse de molécules organiques simples est encore loin d'une forme de vie fonctionnelle et auto-répliquante, avec une organisation cellulaire moderne. De plus, la formation de polymères complexes à partir des monomères obtenus par Miller et Urey n'est pas un processus spontané. Il existe de nombreux modèles traitant de ce qu'il s'est passé entre les deux. Pour résumer, après la synthèse de molécules organiques prébiotiques dans la « soupe primordiale » (ou alternativement leur apport exogène), des nucléotides sont polymérisés en acides ribonucléiques (ARN) (l'hypothèse du monde à ARN, dans lequel les ARN remplissent à la fois le rôle de l'ADN et des protéines, *cf.* Gilbert, 1986), puis une augmentation graduelle de la complexité se met en place, avec l'apparition de membranes phospholipidiques primitives (Chen *et al.*, 2004; Hanczyc *et al.*, 2003; Hanczyc and Szostak,

2004; Orgel, 2004; Zhu and Szostak, 2009; dans Moritz, 2010), suivie par l'émergence de la division cellulaire, puis d'un métabolisme et d'un protéome primitifs, de la sélection naturelle (Moritz, 2010), et d'un génome primitif par liaison des ARN entre eux (Kun *et al.*, 2005; Poole, 2006; dans Moritz, 2010). Finalement, à partir du système ARN/vésicule primitif, on arrive au système ADN/ARN/protéine moderne. Le déroulement de ces événements dans cet ordre représente le modèle « gene-first ». En inversant les étapes du monde à ARN et de l'apparition du métabolisme, cela devient le modèle « metabolism-first ». Alternativement, il est également possible que l'apparition de la vie se soit déroulée sur une autre planète, comme Mars, et que des formes de vie aient été apportées sur la Terre, par des météorites par exemple. C'est la théorie de la panspermie.

De nos jours, malgré la progression des découvertes scientifiques qui nous a permis d'accumuler de nombreux éléments de réponse, et de formuler différentes hypothèses, la question de l'origine de la vie reste majoritairement sans réponse.

1.1.3) Pourquoi chercher la vie ailleurs? Intérêt de Mars et des météorites

Comment la vie est-elle apparue sur Terre ? A-t-elle pu apparaître ailleurs? Ces questions sont interconnectées : en plus d'obtenir des éléments de réponse à la question en elle-même, le fait d'obtenir des informations sur l'origine de la vie sur terre permet d'obtenir des indices sur la possibilité de l'apparition d'une vie ailleurs, et le fait de trouver de la vie ailleurs permettrait de mieux comprendre comment elle est apparue sur terre. La première question trouve sa réponse dans notre compréhension grandissante de l'histoire géologique et climatique de la Terre, de la base moléculaire de la vie, de l'arbre phylogénétique du vivant, des environnements extrêmes dans lesquels la vie peut se développer, et de l'origine des molécules importantes pour la biologie.

Pourquoi chercher la vie ailleurs ? La vie sur Terre est la seule forme de vie que nous connaissons. Ce qui nous empêche de généraliser notre connaissance de la vie, et donc de prédire la fréquence et la nature de la vie ailleurs dans le cosmos. Le fait de trouver de la vie

ailleurs nous permettrait de savoir que la planète Terre n'est pas un cas unique et que des conditions permettant à la vie d'exister sont ou ont été présentes ailleurs. De plus, trouver de la vie ailleurs nous permettrait d'en savoir plus sur la nature du vivant et la manière dont elle peut apparaître, et donc nous renseigner sur la manière dont elle aurait pu apparaître sur terre. Il est possible de rechercher des réponses à l'origine de la vie sur Terre, mais cette recherche est limitée par le recyclage de la croûte Terrestre causé par la tectonique des plaques.

Cependant, il existe d'autres lieux dans le système solaire où la vie aurait pu naître. Parmi ceux-ci, Mars en est une bonne candidate, et sa "proximité" facilite son étude. A l'époque où l'on pense que la vie est apparue sur Terre, les conditions requises pour son apparition sur Mars étaient également réunies (température propice, présence d'eau liquide, présence d'une atmosphère épaisse, source d'énergie), et les composés organiques nécessaires à l'apparition de la vie ont très certainement été apportés à la surface lors de l'épisode du grand bombardement tardif. Le grand bombardement tardif (ou « Late Heavy Bombardment », LHB, en Anglais) est une période pendant laquelle le système solaire interne a été soumis à une fréquence de collisions élevée. Cet événement se serait déroulé entre 4,0 et 3,8 Ga (Claeys and Morbidelli, 2011) (d'autres auteurs considèrent que cette période a duré 700 millions d'années, cf. Lal, 2008). De plus, la croûte martienne n'a pas été recyclée par la tectonique des plaques comme sur Terre, des indices en faveur d'une vie ancienne auraient donc pu être conservés jusqu'à aujourd'hui.

Cependant, les conditions actuelles sur Mars sont peu propices à la vie. A défaut d'en rechercher une preuve intangible, on peut se concentrer sur la recherche d'indices ou traces d'une vie microbienne passée ou présente, sous la forme de molécules organiques.

Il est également intéressant de rechercher ces mêmes molécules organiques dans les météorites. En effet, on pense que les météorites ont participé à l'apport de matière organique sur les planètes telluriques et ont ainsi amené le matériel prébiotique nécessaire à l'apparition de la vie. Certaines de ces molécules organiques ont également été retrouvées dans des nuages interstellaires, et peuvent enfin être synthétisées dans les atmosphères, surfaces, et intérieurs des planètes.

La question de l'origine de la vie et de la possibilité d'une vie ailleurs peuvent donc trouver des éléments de réponse dans l'exploration de notre galaxie et plus particulièrement de notre système planétaire. Ces éléments de réponse sont recherchés sous la forme d'indices ou de preuves d'une vie passée ou présente.

1.1.4) Conclusion

Bien que ne possédant pas de définition définitive, le vivant peut être décrit comme un ensemble de caractéristiques, ce qui permet de résumer la vie à un système chimique auto-régulé et auto-organisé, capable d'échanges avec l'extérieur, de croissance, de réponse aux stimuli, et soumis à l'évolution Darwinienne grâce à sa capacité de reproduction. Afin de répondre aux questions de l'origine de la vie sur Terre et de la possibilité d'une vie ailleurs, on peut chercher à en apprendre plus sur la façon dont la vie est apparue à partir de molécules organiques prébiotiques sur la Terre primitive, et s'est complexifiée pour atteindre le fonctionnement cellulaire que l'on connaît actuellement. On peut également – et c'est ce point que cette thèse va traiter – chercher, grâce à l'exploration de la galaxie et du système solaire, des éléments de réponse dans des milieux extraterrestres, notamment sur Mars (recherche de traces de vie sous la forme de molécules organiques) et dans les météorites (ces dernières ayant pu participer à l'apparition de la vie sur Terre et sur d'autres planètes via l'apport de molécules organiques).

1.2) Que chercher : bioindices et biomarqueurs

Même s'il est possible qu'il existe des formes de vie différentes de la nôtre (par exemple non basée sur des molécules organiques carbonées), on va chercher prioritairement une vie ressemblant à celle que l'on connaît. Cette recherche se fait là où il est probable que la vie soit apparue, c'est-à-dire dans les endroits où les conditions sont favorables à son apparition. Ces conditions peuvent être réunies sur les planètes telluriques orbitant au sein de la zone habitable de leur étoile (par exemple sur la Terre ou Mars dans le système solaire), voire sur des satellites de géantes gazeuses hors de la zone d'habitabilité (par exemple sur

Titan, lune de Saturne, ou Europe, lune de Jupiter). La zone habitable d'une étoile représente la région autour de l'étoile dans laquelle de l'eau liquide peut exister à la surface d'une planète (Kane and Gelino, 2012). On va donc chercher dans notre système solaire, mais aussi dans les autres systèmes planétaires. Cependant, des limitations existent : suivant l'éloignement de l'endroit où l'on cherche, on ne pourra pas mettre en œuvre les mêmes techniques. Pour les exoplanètes par exemple, on ne pourra détecter qu'une signature globale par spectroscopie, comme la présence d'O₂ dans l'atmosphère. Dans le système solaire, on pourra par contre envoyer des sondes qui observeront les surfaces planétaires, ainsi que des atterrisseurs (landers) et rovers. Ces derniers prélèveront des échantillons de l'environnement, afin de déterminer la minéralogie des sols, la composition de l'atmosphère, et de rechercher de potentielles molécules organiques.

La recherche de vie extraterrestre passe donc par la recherche de phénomènes ayant pu être produits par cette vie (passée ou présente). Si ce phénomène n'a pu qu'être produit exclusivement par la vie (c'est à dire d'origine biotique), on parlera de biomarqueur. Un biomarqueur peut être interprété sans ambiguïté comme ayant été produit par la vie (par exemple : fossiles d'origine biotique non discutable, signatures isotopiques, molécules organiques complexes d'origine biotique). Si ce phénomène a pu être produit par la vie, mais a également une possible origine abiotique, on parlera alors de bioindice (Steele *et al.*, 2006). Sur Mars, par exemple, on pourra chercher des biomarqueurs sous la forme de protéines (uniquement synthétisées par des organismes vivants), d'acides nucléiques (vecteurs de l'information génétique, nécessaires à l'évolution biologique au sens Darwinien), ou de lipides (constituants des membranes cellulaires) ; et des bioindices sous la forme d'acides aminés (constituants des protéines), bases azotées (éléments constitutifs des acides nucléiques) et acides carboxyliques (intermédiaires métastables de l'oxydation des composés organiques sur Mars).

Il existe différents types de biomarqueurs / bioindices, par exemple les signatures morphologiques, sédimentaires, minérales, les signatures isotopiques, les signatures métaboliques, la présence de biopolymères et de leurs monomères (ainsi que leurs propriétés).

1.2.1) Signatures morphologiques, sédimentaires et minérales

1.2.1.1) Signatures morphologiques

La présence de fossiles d'êtres pluricellulaires dans un milieu extraterrestre serait une preuve irrévocable de la présence d'une vie passée ou présente. Cependant, la présence de fossiles d'unicellulaires, ou la trace d'une inclusion de cellule au sein d'un minéral, est plus difficile d'interprétation. Certaines structures observées peuvent être d'origine abiotique. En 1996, les interprétations initiales et controversées de la météorite ALH84001, d'origine martienne (Mittlefehldt, 1994), incluent des morphologies de l'ordre du nanomètre, interprétées comme pouvant être des restes de nanobactéries (McKay *et al.*, 1996). Cependant ces morphologies peuvent également avoir une origine abiotique par le biais de processus physico-chimiques. Pour être reconnues comme biomarqueurs, des fossiles microbiens devraient donc posséder des attributs physico-chimiques indiquant clairement l'origine biotique de ces structures.

1.2.1.2) Structures sédimentaires d'origine microbienne

Sur Terre, les communautés microbiennes benthiques sont susceptibles d'influencer la microstructure des dépôts s'accumulant en leur présence. Les stromatolithes, par exemple (Figure I-1), sont une des formes les plus importantes d'évidence de vie microbienne fossilisée sur la terre primitive (Schopf *et al.*, 2007). Ce sont des structures laminées qui résultent d'une activité biologique, essentiellement due à des organismes microbiens. La détection de telles structures sur Mars pourrait donner un indice en faveur d'une vie passée ou présente sur la planète. Les films et les tapis microbiens sont d'autres structures sédimentaires d'origine microbienne susceptibles de laisser des bioindices.



Figure I-1 : stromatolithes en développement dans la baie Shark en Australie

1.2.1.3) Biominéralisation

La biominéralisation est le procédé par lequel les organismes vivants produisent des solides inorganiques. Il existe plusieurs types de biominéraux, comme par exemple le carbonate de calcium (par exemple la calcite, utilisée pour l'exosquelette des coccolithophoridés, ou trouvée sous forme de cristaux – les otolithes – situés dans l'oreille interne des vertébrés), le phosphate de calcium (utilisés pour les os et les dents), les oxydes de fer (comme la magnétite, permettant à certaines bactéries de percevoir les champs magnétiques).

1.2.2) Signatures isotopiques

Les ratios isotopiques du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $\delta^{13}\text{C}$) ont été utilisés pour la recherche des premières traces de vie sur Terre (Mojzsis *et al.*, 1996; van Zuilen *et al.*, 2002), ainsi que pour déterminer l'origine extraterrestre des molécules organiques trouvées dans les météorites carbonées (Botta and Bada, 2002). Le $\delta^{13}\text{C}$ mesure la différence entre le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ d'un échantillon et ce même rapport trouvé dans le monde inorganique. De manière

générale, le ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est plus faible chez les êtres vivants que dans le monde inorganique. Cela est dû au fait que lors de la fixation du carbone inorganique en carbone organique, par exemple lors de la photosynthèse, réalisée par les plantes et les cyanobactéries, les êtres vivants font un fractionnement isotopique, c'est-à-dire qu'ils « préfèrent » utiliser le ^{12}C , plus léger que son isotope ^{13}C . Ce ratio reste préservé au sein des molécules organiques après la mort des organismes. Cet enrichissement, ne présentant pas de source abiotique possible, peut être utilisé comme biomarqueur. La sonde Beagle 2 de la mission Mars Express (ESA) aurait dû mesurer la proportion des isotopes du carbone à la surface de Mars.

D'autres ratios isotopiques peuvent être utilisés en tant que bioindices, du fait de leur fractionnement au cours du métabolisme bactérien. Par exemple, l'abondance de l'hydrogène par rapport à son isotope lourd, le deutérium (rapport $^1\text{H}/^2\text{H}$). La détection d'un ratio enrichi en ^1H , similaire à ce qui est trouvé chez les bactéries méthanogènes sur terre, pourrait donner un indice quant à la présence de microorganismes en dehors de la Terre (Brack *et al.*, 1999). De la même manière, l'analyse isotopique des éléments O, N et S peut être utilisée.

1.2.3) Signatures métaboliques

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'une cellule. Il peut être divisé en deux parties : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme est l'ensemble des réactions qui libèrent de l'énergie. Il se fait par décomposition de molécules complexes en composés plus simples (par exemple la respiration, qui décompose le glucose et produit du dioxyde de carbone et de l'eau). L'anabolisme est l'ensemble des réactions qui consomment de l'énergie, ce qui est notamment le cas des réactions de synthèse de molécules complexes à partir de molécules simples (par exemple la synthèse des protéines à partir des acides aminés). Dans le but de chercher des indices de vie, il est donc possible de chercher des produits à la fois du catabolisme et de l'anabolisme.

De nombreuses réactions endergoniques (nécessitant un apport d'énergie) ont lieu dans la cellule. Dans cette dernière, la majorité de ces réactions se fait au moyen d'un couplage avec l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) (par exemple pour la réalisation

d'un transport actif d'ions à travers une membrane ; ou la réalisation d'un travail mécanique, comme le mouvement des cils et des flagelles). La molécule d'ATP est constituée de trois groupements phosphates, d'un ribose et d'une adénine (Figure I-2). Elle est synthétisée lors de la glycolyse, et son hydrolyse libère l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme. Il existe d'autres réactions d'hydrolyse libérant bien plus d'énergie que celle de l'ATP, mais seule cette dernière a été retenue au cours de l'évolution en tant que molécule universelle du couplage énergétique, du fait de sa capacité à permettre la réaction de tous les couplages tout en minimisant le gaspillage. La détection de cette molécule pourrait donc être un indice fort en faveur d'une vie passée ou présente. Cependant, cette molécule est fragile, et dans conditions martiennes par exemple, se dégrade vite à l'échelle des temps géologiques (il a été estimé qu'une réduction de 99% des quantités d'ATP sur la surface d'une sonde posée à la surface de Mars prendrait de 158 à 32000 sols ; Schuerger *et al.*, 2008). Trouver cette molécule impliquerait donc que le métabolisme l'ayant synthétisé est récent à l'échelle géologique. Au sein des cellules, l'ATP est consommé au fur et à mesure qu'il est produit. Il peut cependant se trouver à l'extérieur des cellules suite à la mort de ces dernières. L'ATP peut être quantifiée en mesurant la quantité de lumière produite par sa réaction avec l'enzyme luciférase. L'ATP sert également de précurseur dans la synthèse des acides nucléiques.

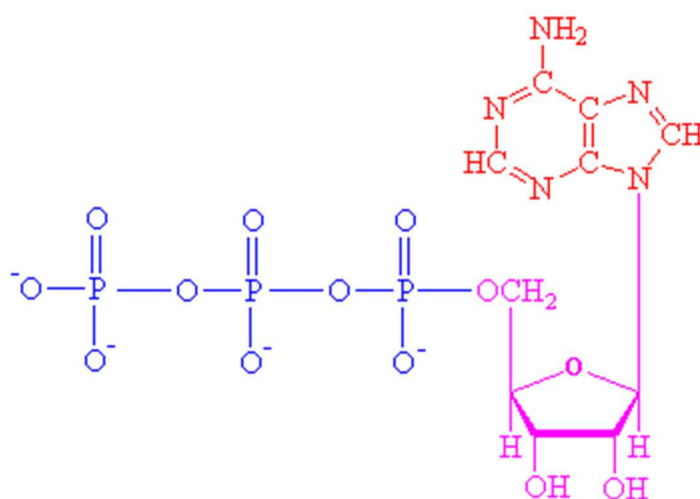


Figure I-2 : structure de l'ATP (adénine en rouge, ribose en rose, groupements phosphate en bleu)

Certains produits ou intermédiaires du métabolisme peuvent être recherchés, comme les gaz biogéniques. Sur Terre, les gaz biogéniques principaux sont le dioxygène O₂ (et le

produit de sa photolyse, l'ozone O_3), le protoxyde d'azote N_2O , et le méthane CH_4 . D'autres composés sont produits par certains métabolismes, comme le diméthyl sulfide (DMS), produit par le phytoplancton. L' O_2 est produit lors de la photosynthèse, réalisée par les organismes photoautotrophes (capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie et le CO_2 atmosphérique comme source de carbone), comme les plantes et les cyanobactéries. Grâce à la lumière, le CO_2 et l'eau (pouvoir réducteur), l'organisme synthétise ses composés organiques tout en rejetant de l' O_2 . La production de dioxygène par la photosynthèse nous fournit l'évidence la plus claire de l'impact de la vie sur la chimie atmosphérique terrestre : la grande oxydation ou « catastrophe de l'oxygène » (ou « Great Oxidation Event », GOE, en Anglais). Cet événement est généralement considéré comme s'étant déroulé il y a environ 2,3 Ga (Crowe *et al.*, 2013; Holland, 2002) ou 2,4 Ga (Buick, 2008). Certains auteurs considèrent qu'il s'est déroulé au cours d'une période s'étendant entre 2,22 et 2,45 Ga (Anbar *et al.*, 2007). La photosynthèse, quant à elle, est apparue bien avant la grande oxydation, certains indices en faveur de son existence remontant aussi tôt qu'il y a 3,8 Ga environ (Buick, 2008). De plus, de l'oxygène était déjà présent dans l'atmosphère avant la grande oxydation, par exemple il y a 2,5 Ga (Anbar *et al.*, 2007) et 3 Ga (Crowe *et al.*, 2013). La présence d' O_2 dans une atmosphère semblerait donc représenter un bon indice en faveur d'une vie passée ou présente. Le N_2O est produit lors de dénitrification (conversion microbienne des nitrates en nitrites puis en composés azotés gazeux). Le CH_4 est quant à lui produit par des microorganismes lors de la méthanogenèse. Ces gaz peuvent être recherchés en tant que bioindices notamment sur les planètes extrasolaires, grâce à l'observation spectroscopique de leurs atmosphères, mais également dans les atmosphères des planètes du système solaire.

Sur les exoplanètes, la détection spectroscopique (par exemple grâce aux missions annulées Terrestrial Planet Finder de la NASA, et Darwin de l'ESA) d' O_2 ou O_3 pourrait révéler la présence d'une vie passée ou présente. Bien qu'essentiel à la vie telle qu'on la connaît, l'eau liquide n'est pas considérée comme une preuve de vie. Une détection conséquente de CO_2 indiquerait une atmosphère typique d'une planète terrestre. Une détection de CH_4 pourrait indiquer une source biotique, mais est également interprétable par un processus abiotique (production à partir de la croûte et du manteau supérieur) (Des Marais *et al.*, 2002).

Sur Mars, trois expériences réalisées par les sondes Viking avaient pour but de détecter la vie. L'expérience « Gas Exchange Experiment » (Oyama and Berdahl, 1979, 1977) avait pour but de déterminer si une hypothétique vie microbienne martienne pouvait métaboliser, de manière hétérotrophe, des nutriments, avec pour conséquence la libération de gaz. Des nutriments en solution aqueuse ont été apportés au sol martien. Du CO₂ et de l'O₂ ont été émis par le sol, résultat positif pouvant indiquer la présence de vie. L'expérience « carbon assimilation experiment » cherchait à montrer la présence de vie par l'incorporation, en présence de lumière, de dioxyde / monoxyde de carbone radioactivement marqué (c'est-à-dire la photosynthèse). Enfin, l'expérience « labeled release experiment » cherchait à détecter un métabolisme hétérotrophe par la libération de carbone marqué et initialement incorporé au sein de molécules organiques dans une solution comportant des nutriments. Ces deux expériences ont également donné des résultats positifs (Navarro-González *et al.*, 2006). Cependant, les analyses par « thermal volatilization – gas chromatography – mass spectrometry (TV-GC-MS) » n'ont pas permis la détection de molécules organiques à des limites de détection de l'ordre du ppb (partie par milliard, « parts-per-billion » en Anglais) (pour des molécules de taille supérieure à 2 atomes de carbone) et du ppm (partie par million, « parts-per-million » en Anglais) (pour des molécules de taille moins importante) (Navarro-González *et al.*, 2006). L'explication la plus plausible pour la réactivité observée lors des trois expériences biologiques serait alors une activité chimique et non biologique, due à la présence dans le régolithe de un ou plusieurs oxydants inorganiques, tels que peroxydes ou superoxydes (Yen, 2000), notamment du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Zent and McKay, 1994) ; ou des perchlorates (Navarro-González *et al.*, 2010).

La présence de méthane dans l'atmosphère martienne est une question d'intérêt et d'actualité, car elle pourrait traduire la présence de vie, bien que ce gaz puisse également être de nature abiotique (*e.g.* origine géologique). Depuis 2004, du CH₄ a été détecté sur Mars à de multiples reprises, à partir d'observations depuis la Terre et l'orbite martienne (Atreya *et al.*, 2007; Fonti and Marzo, 2010; Formisano *et al.*, 2004; Geminale *et al.*, 2011; Krasnopolsky, 2012, 2011; Mumma *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2013). Il a parfois été détecté de manière locale (sous forme de panaches), et à des concentrations allant jusqu'à environ 60 parties par milliards par volume (ppbv). Cependant, dans un premier temps, l'analyse répétée *in situ* d'échantillons de l'atmosphère martienne par le « Tunable Laser Spectrometer » (TLS),

instrument de l'expérience « Sample Analysis at Mars » (SAM) sur le rover Curiosity (mission MSL, de la NASA) s'est révélée négative (Webster *et al.*, 2013), avec une valeur détectée de $0,18 \pm 0,67$ ppbv, soit une valeur maximale détectée de 1.3 ppbv (intervalle de confiance 95%). Même si cette mesure est locale, ce résultat a réduit la probabilité d'une activité microbienne méthanogénique actuelle sur Mars. Néanmoins, par la suite, des mesures réalisées par TLS se déroulant sur une période de 20 mois ont permis de mettre en évidence des quantités de méthane avec une valeur moyenne de $0,69 \pm 0,25$ ppbv (intervalle de confiance 95%). Cette abondance est plus faible que celle estimée dans les modèles où le méthane provient de la dégradation par UV de matière organique présente au sein de poussières interplanétaires / matériel chondritique carboné présents sur Mars. Selon les auteurs, elle correspondrait probablement à l'abondance moyenne de méthane dans l'atmosphère martienne (Webster *et al.*, 2015). Toutefois, lors de quatre mesures réparties sur une période de 60 sols, des niveaux de méthane de $7,2 \pm 2,1$ ppbv (intervalle de confiance 95%) ont été observés, ce qui implique que Mars produit épisodiquement du méthane depuis une source additionnelle et inconnue, potentiellement biotique (organismes méthanogènes) ou abiotique (*e.g.*, impact météoritique, origine géologique telle que la serpentinisation de l'olivine, libération par des clathrates en sous-surface, érosion de basalte comportant des inclusions de méthane, production géothermique) (Webster *et al.*, 2015).

1.2.4) Présence de biopolymères, leurs monomères, et autres molécules organiques

Certaines molécules organiques, si détectées, pourraient prouver ou donner des indices en faveur d'une vie passée ou présente.

En effet, les êtres vivants synthétisent nombre de molécules organiques nécessaires à leur fonctionnement, ce qui ferait de ces molécules des biomarqueurs dans le cas de leur détection sur d'autres planètes. Les biopolymères (tels que les acides nucléiques, protéines, polysaccharides), mais aussi les lipides, en font partie.

De plus, à la mort des organismes vivants, la matière organique les constituant est dégradée. L'accumulation de débris organiques peut par exemple entraîner la transformation des lipides et protéines en hydrocarbures par des micro-organismes. Ce processus de

diagenèse biochimique aboutit à la formation de kérogènes. Cela se traduit également, pour les biopolymères, par leur dégradation en monomères. Finalement, l'oxydation des molécules organiques sous les conditions martiennes pourrait conduire à la présence de leurs intermédiaires métastables : les acides carboxyliques.

1.2.4.1) Biomarqueurs

La vie telle qu'on la connaît est basée sur une unité de base : la cellule. La cellule est constituée de molécules telles que les acides nucléiques, les protéines, les polysaccharides (tous les trois des biopolymères), et les lipides.

1.2.4.1.1) Biopolymères

Acides nucléiques

Les acides nucléiques utilisés par le vivant sont l'ADN et l'ARN (Figure I-3). La structure de l'ADN a été déterminée en 1953 (Watson and Crick, 1953). Les acides nucléiques sont des polymères, dont l'unité de base est le nucléotide. Les nucléotides sont composés de bases azotées (aussi appelées bases nucléiques), de sucres (désoxyribose) et de groupements phosphates. L'ADN est le porteur de l'information génétique, constitué par l'enroulement de deux chaînes de nucléotides. Au cours de la transcription, il est déroulé et lu par l'enzyme ARN polymérase, qui va synthétiser un brin d'ARN messenger complémentaire, destiné à être traduit par les ribosomes, afin de synthétiser les protéines par assemblage d'acides aminés. Les ARN possèdent plusieurs rôles : support temporaire de l'information génétique (ARN messenger), catalyseur enzymatique (ribozymes), cofacteurs, régulateurs de l'expression génétique, aide pendant la traduction (ARNt). La détection d'ADN dans un milieu extraterrestre permettrait de conclure sans doute à la présence de vie : cette molécule ne peut pas se former spontanément dans l'environnement.

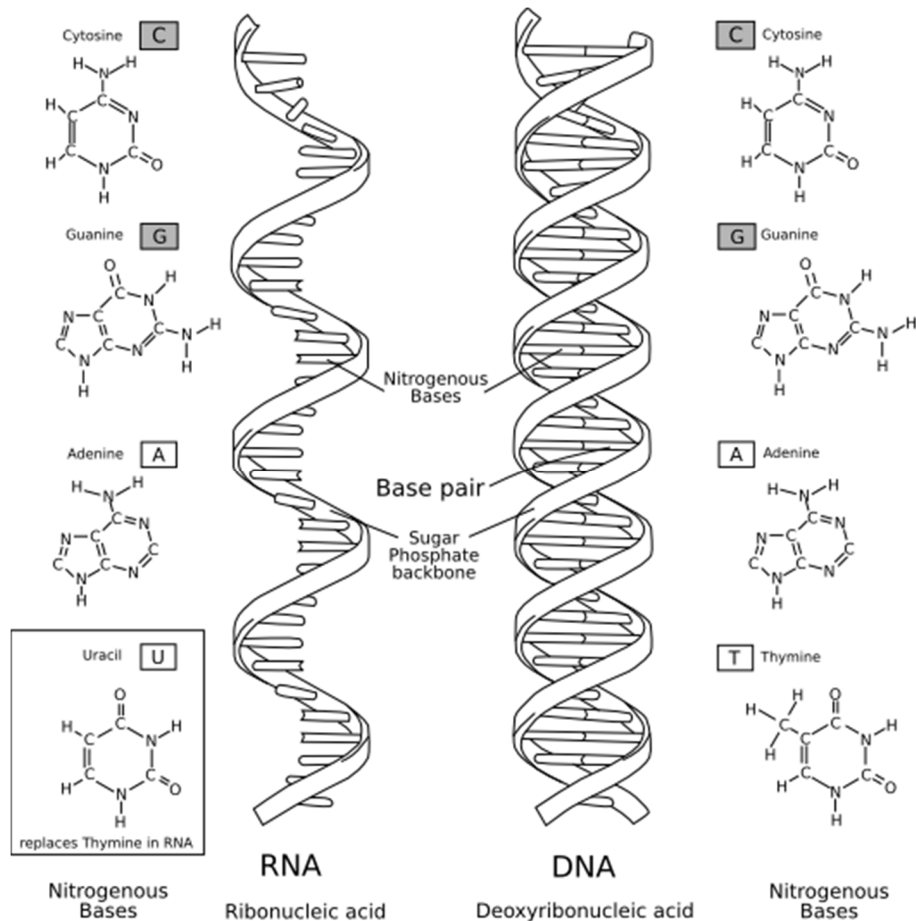


Figure I-3 : ARN et ADN avec leurs bases nucléiques respectives

Protéines

Les protéines sont des polymères d'acides aminés, possédant de nombreux rôles, tels que des rôles structuraux, de mobilité, de catalyse, de régulation et compaction de l'ADN, d'expression des gènes, de transport. De même que pour l'ADN, la présence de protéines permettrait de conclure positivement sur la présence de vie. En effet, bien que des liaisons peptidiques puissent être synthétisées de manière abiotique (Griffith and Vaida, 2012), les protéines nécessitent la transcription à partir d'ADN et la traduction, par d'autres macromolécules complexes, afin d'être synthétisées.

Polysaccharides et autres osides

Les glucides regroupent les oses (également appelés monosaccharides) et les osides (polymères constitués d'oses). Les osides sont des polymères d'oses parmi lesquels on distingue les hétérosides (dont l'hydrolyse libère des oses et des composés non glucidiques) et les holosides (dont l'hydrolyse ne libère que des oses). Parmi les holosides, on peut distinguer les oligosides (formés de 2 à 10 molécules d'oses) et les polyosides (formés de 10 à plusieurs milliers d'oses, aussi appelés polysaccharides) (Figure I-4). Les hétérosides et polyosides possèdent des fonctions importantes chez les êtres vivants. Il existe des polyosides homogènes et des polyosides hétérogènes.

Les polyosides homogènes sont formés par la condensation répétitive d'un ose par liaison osidique. Ils possèdent deux types de fonctions :

- Réserve d'énergie: ce sont par exemple les glucosanes (amidon et glycogène). Chez les plantes, l'amidon sert au stockage des glucides photosynthétisés. Le glycogène est un polyglucose que les animaux mettent en réserve dans le cytosol des hépatocytes (jouant un rôle dans la glycémie) et dans les muscles.

- Structure : ces polyosides forment les armatures des exosquelettes d'algues, de végétaux (cellulose) et d'animaux (carapace de chitine des arthropodes).

Les polyosides hétérogènes sont des chaînes d'oses (ou dérivés) différents, la plupart du temps limités à deux types. Les gommés (partie hydrophile des sécrétions de certaines plantes) et la gélose (extrait d'algues rouges utilisé en microbiologie pour la culture cellulaire) en font partie.

Les hétérosides sont des molécules résultant de l'association covalente de glucides avec d'autres types de molécules, par exemple les glycolipides (lipides de membranes portant des chaînes oligo ou polyosidiques) ou les glycoprotéines (protéines sur lesquelles sont greffées des chaînes glucidiques courtes).

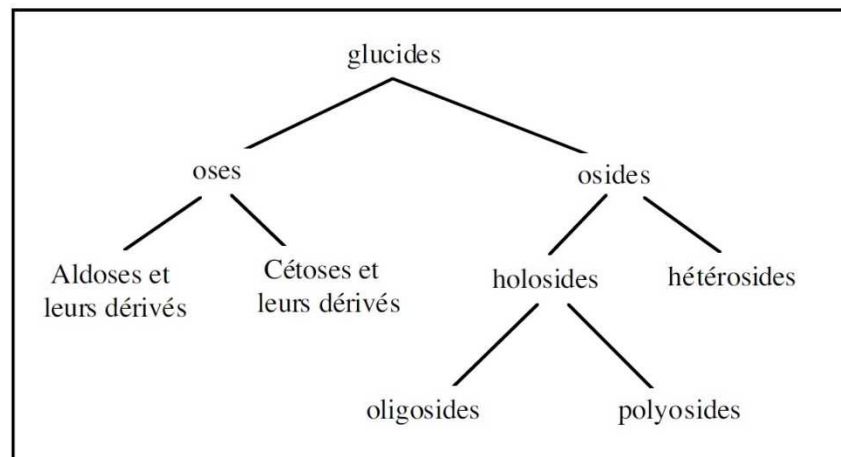


Figure I-4 : les glucides (source : Aix-Marseille Université)

1.2.4.2.2) Lipides

Les lipides sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles de structures diverses, possédant des fonctions biologiques nombreuses et variées, comme le stockage et la production d'énergie (triglycérides), la structure des membranes cellulaires (la propriété amphiphile des phospholipides leur permettant de former une double membrane), la transmission des messages hormonaux. Ils sont également synthétisés via des processus métaboliques complexes.

Les acides gras, notamment (qui font partie des lipides), possèdent des rôles variés au sein de la cellule, comme le stockage de l'énergie (en tant que triglycérides stockés dans les tissus adipeux), la structure (ils servent à la synthèse des phospholipides, constituants des membranes cellulaires), le message hormonal (précurseurs de plusieurs hormones). Ils sont synthétisés par les organismes vivants au cours de la lipogenèse. Lors de leur dégradation, les acides gras seront transformés en acides carboxyliques, qui eux sont beaucoup plus résistants à la dégradation.

1.2.4.2) Bioindices

Les macromolécules précédemment citées nous permettent d'assurer que la vie est ou a été présente (biomarqueurs), cependant, elles sont facilement dégradées. Par exemple, sur

Mars, la présence de puissants oxydants dans le régolithe, ainsi que l'exposition aux radiations ionisantes aurait pu détruire ou altérer de telles molécules.

En effet, les biopolymères, tels que l'ADN, l'ARN et les protéines, se dégradent rapidement sous l'action du rayonnement ultraviolet (UV) et des conditions oxydantes de la surface martienne (Martins, 2011). A titre d'exemple, il est peu probable que l'ADN reste intact pour plus de 100 000 ans, dans les conditions terrestres (et donc avec une protection vis-à-vis du rayonnement UV plus importante que sur Mars, résultant de la présence d'une atmosphère plus épaisse). En effet, des études théoriques et expérimentales ont montré que l'ADN est le mieux préservé dans des environnements froids, secs et protégés des UV, et dans des restes d'être vivants âgés de moins de 100 000 ans (Wayne *et al.*, 1999).

La recherche de traces d'une vie passée ou présente va donc se focaliser sur la recherche des produits de dégradation de ces macromolécules. En effet, la dégradation des biopolymères entraîne la libération de leurs monomères. Pour les acides nucléiques, les protéines et les osides, cela correspond à leurs blocs constitutifs, respectivement les bases azotées, les acides aminés, et les oses. De plus, les molécules organiques potentiellement présentes sur Mars pourraient avoir été oxydées, conduisant à la présence d'acides carboxyliques.

1.2.4.2.1) Monomères

Bases azotées

Les blocs constitutifs des acides nucléiques sont les bases azotées (aussi appelées bases nucléiques ou nucléobases) (Figure I-5). Il existe cinq bases azotées: deux bases puriques (l'adénine et la guanine), et trois bases pyrimidiques (la cytosine, la thymine et l'uracile). L'adénine s'apparie avec la thymine (grâce à deux liaisons hydrogènes), et la cytosine avec la guanine (grâce à trois liaisons hydrogènes), ce qui permet la conformation de l'ADN en double brin. Au sein de l'ARN (qui n'existe qu'en simple brin), la thymine est remplacée par l'uracile. Lorsqu'un sucre (ribose ou désoxyribose – donnant leur nom à l'acide ribonucléique ou désoxyribonucléique) est lié à une base azotée, on parle de nucléoside. Lorsque les nucléosides sont phosphorylés (ajout d'un groupement phosphate), on parle de nucléotides (Figure I-5). L'uracile a été détectée dans la météorite Murchison (Martins *et al.*, 2008).

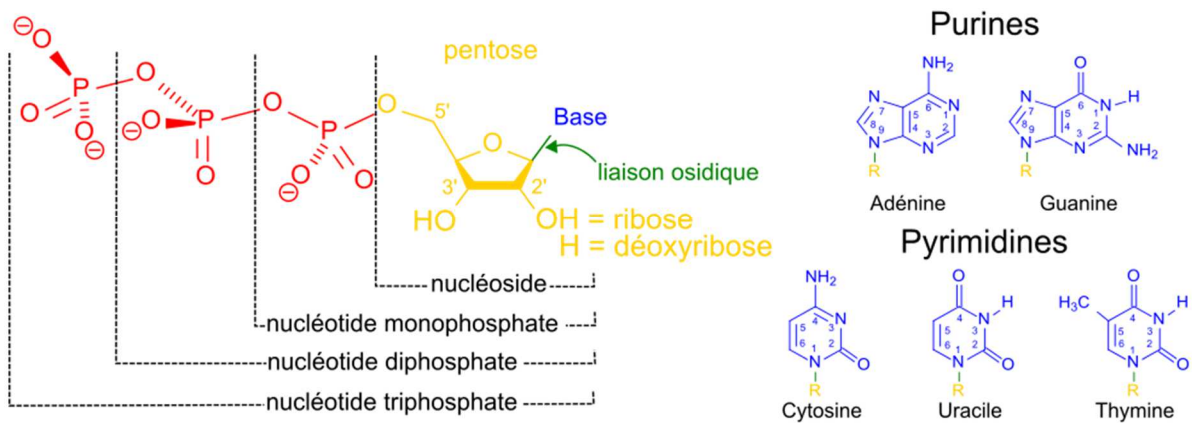


Figure I-5 : structure d'un nucléotide et structures des bases nucléiques

Il existe d'autres bases azotées, comme la xanthine et l'hypoxanthine, qui ont été découvertes dans certaines chondrites carbonées (Murchison, Murray et Orgeuil) (Stoks and Schwartz, 1981, 1979). Afin de différencier l'origine terrestre ou extraterrestre de ces bases azotées, la mesure des isotopes stables du carbone ou de l'azote est utilisée.

Acides aminés et chiralité

Les acides aminés sont essentiels à la biochimie, en tant que monomères des protéines. Toutes les protéines des êtres vivants ne sont constituées que de 20 acides aminés différents (auxquels on peut rajouter deux acides aminés plus rares : la pyrrolysine et la sélénocystéine) (Figure I-6).

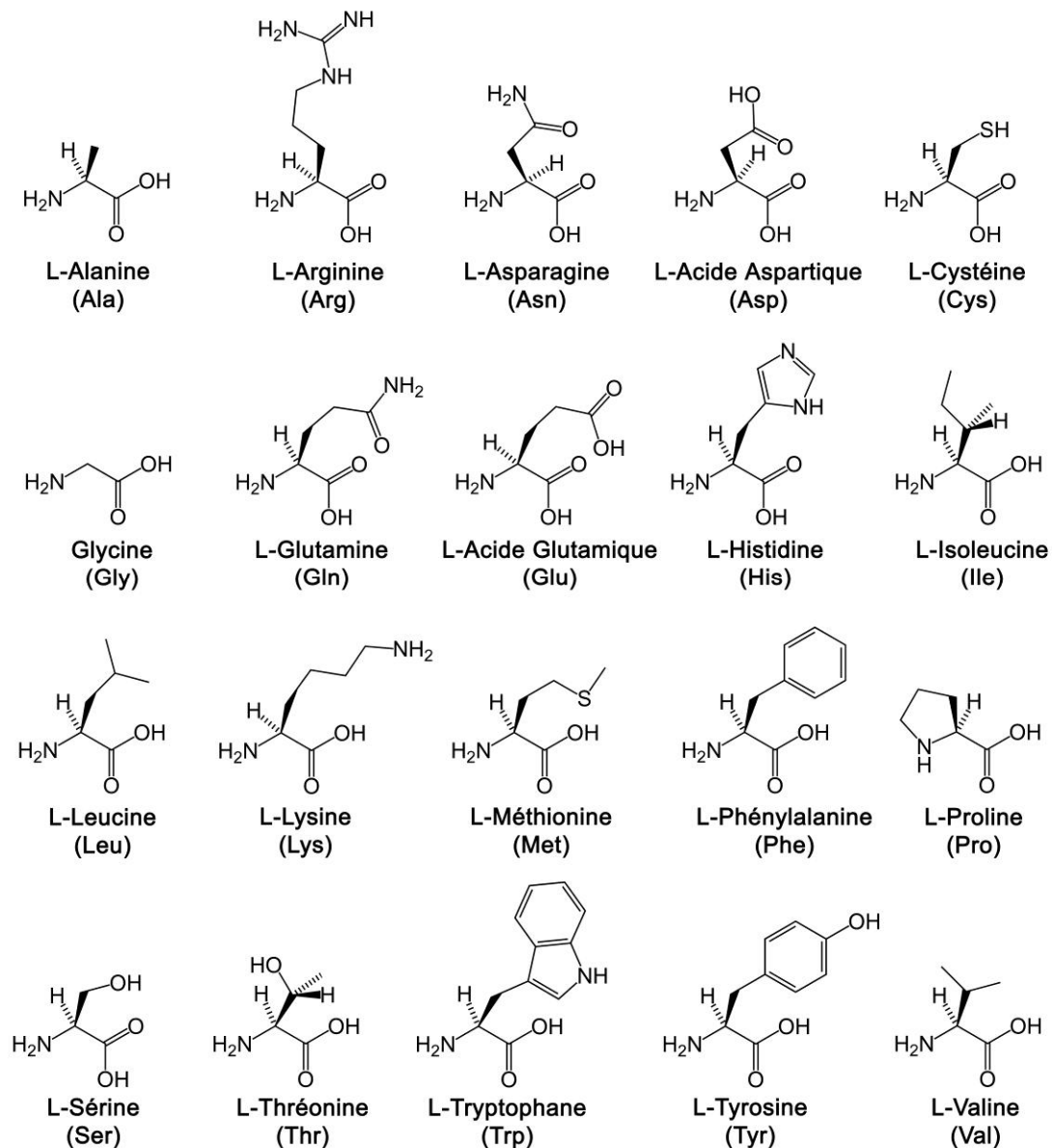


Figure I-6 : les 20 acides aminés du vivant

Ils sont codés au sein de l'ADN par des codons et sont liés ensemble par des liaisons peptidiques. Ce sont des molécules constituées d'une fonction amine basique (NH_2), d'une fonction carboxyle (COOH), d'un atome d'hydrogène, et d'une chaîne latérale (R), tous rattachés à un atome de carbone (le carbone alpha) (Figure I-7). Les acides aminés possèdent donc deux groupements ionisables, l'un acide et l'autre basique. A pH physiologique, ils sont le plus souvent sous la forme (NH_3^+) et (COO^-). La chaîne latérale est responsable des propriétés de l'acide aminé (par exemple, les acides aminés polaires ont tendance à occuper la surface des protéines).

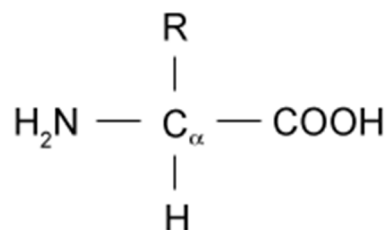


Figure I-7 : structure d'un acide aminé

Lorsque le carbone alpha porte quatre groupements différents, on parle de carbone asymétrique (c'est le cas de l'ensemble des acides aminés, sauf la glycine qui porte deux H sur son carbone alpha). Les molécules possédant un carbone asymétrique sont chirales. Un objet ou un système est appelé chiral s'il n'est pas superposable à son image dans un miroir plan (Figure I-8). Le mot chiralité vient du grec *cheir* qui signifie main. Les deux versions d'une molécule chirale (non superposables à leur image dans un miroir) sont appelées énantiomères. Selon Kelvin, en 1893, « J'appelle toute figure géométrique, ou groupe de points, chiral(e), et possédant la chiralité, si son image dans un miroir plan [...] ne peut pas être amenée à coïncider avec elle(lui)-même ».

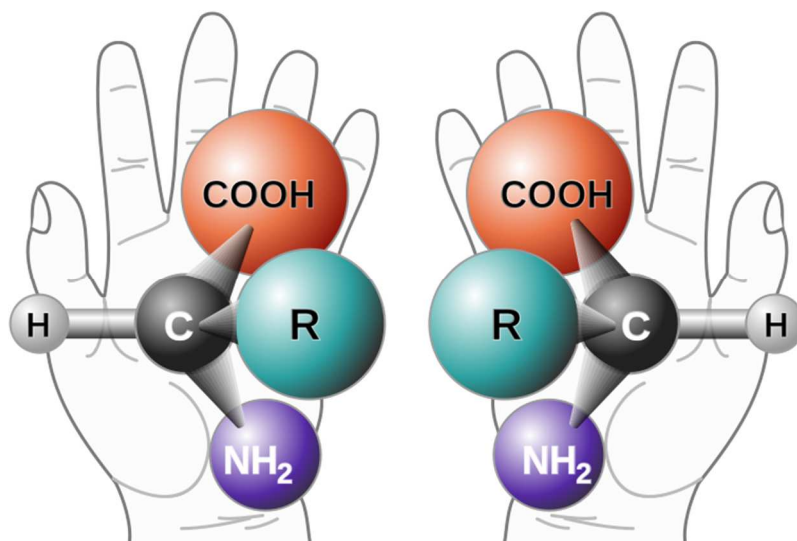


Figure I-8 : la chiralité des acides aminés

La chiralité entraîne la propriété qu'à une molécule de dévier le plan de polarisation d'une lumière incidente polarisée linéairement. Lorsque la lumière, traversant une solution contenant la molécule, est déviée vers la droite, on dira de cette molécule qu'elle est dextrogyre (du latin *dextro*, droite) (notée « + », ou « d »). Lorsqu'elle est déviée vers la gauche

on dira qu'elle est lévogyre (du latin *laevus*, gauche) (notée « - » ou « l »). C'est la nomenclature optique.

Il existe une autre nomenclature, R/S (nomenclature Cahn-Ingold-Prelog), déterminée par un classement des groupements autour du centre asymétrique de la molécule par ordre de priorité chimique. En représentant une flèche contournant la molécule dans le sens de priorité décroissante, on est renseigné sur la configuration de la molécule : R (du latin *rectus*, droit) si la flèche tourne vers la droite, S (du latin *sinister*, gauche) si elle tourne vers la gauche.

La nomenclature la plus utilisée en biologie est la nomenclature D/L. Elle obéit à des règles floues, et n'a pas nécessairement de rapport avec la direction de la déviation de la lumière polarisée.

Les énantiomères ont théoriquement des réactivités identiques avec d'autres molécules non chirales. Cependant, deux énantiomères d'une même molécule peuvent avoir des effets différents, voire même antagoniques, au niveau physiologique. Par exemple, le (R)-limonène possède une odeur d'orange, alors que le (S)-limonène possède une odeur de citron. Le (R)-propanolol est un contraceptif, alors que le (S)-propanolol est un β -bloquant. Le (+)-(7R, 8S)-7,8-époxy-2-méthyl-octadécane, ou disparlure, est une phéromone sexuelle du Bombyx disparate *Lymantria dispar*, alors que son isomère (-) n'a aucune action biochimique.

Lorsque la vie utilise des molécules chirales, bien qu'il en existe deux énantiomères, elle n'utilise qu'une des deux formes. Fisher a démontré que c'était le cas des acides aminés, qui ne sont utilisés que sous la forme L (la glycine étant achirale), et des sucres, utilisés uniquement sous la forme D. On parle d'homochiralité du vivant. Dans les systèmes abiotiques, ces molécules sont présentes sous les formes D et L avec un ratio de 50:50 (mélange racémique). Miller, par exemple, a obtenu, lors de ses expériences, des mélanges racémiques. L'homochiralité est essentielle au fonctionnement des protéines et à la structure de l'ADN et de l'ARN, qui nécessite l'incorporation de sucres D.

Si des acides aminés sont détectés, par exemple sur Mars, la présence d'un excès énantiomérique (déséquilibre du ratio en faveur d'une des deux formes énantiomériques)

donnerait un indice de plus en faveur d'une origine biotique de ces molécules. Des excès énantiomériques d'acides aminés ont déjà été détectés sur des météorites (Cronin and Pizzarello, 1997; Engel and Macko, 1997; Glavin and Dworkin, 2009; Pizzarello, 2006).

Oses et chiralité

Les glucides que l'on pourrait rechercher en tant que traces de vie sont ceux qui sont incorporés dans les osides et dans les acides nucléiques : les oses. Les oses, monomères des osides, ne sont pas hydrolysables et portent la plupart du temps de 3 à 7 atomes de carbone. Ce sont des polyols qui portent au moins deux fonctions hydroxyles, dont l'une au moins est une fonction primaire, et une fonction réductrice carbonylée (aldéhyde ou cétone). Au sein des acides nucléiques, les oses utilisés sont le ribose (pentose, ose en C₅) pour l'acide ribonucléique, et le désoxyribose (dérivé du ribose par substitution du d'un groupement hydroxyle par un hydrogène) pour l'acide désoxyribonucléique. Les oses sont également des objets chiraux. Le vivant tel que nous le connaissons utilise principalement les oses sous leur forme D. Des oses ont été détectés dans les météorites (Cooper *et al.*, 2001; Sephton and Botta, 2005).

1.2.4.2.2) Acides carboxyliques

La détection d'acides carboxyliques dans des milieux extraterrestres, notamment sur Mars, pourrait représenter un bioindice intéressant. En effet, Benner *et al.* (2000), en considérant l'hypothèse selon laquelle le régolithe martien pourrait comporter un oxydant puissant qui convertirait l'ensemble des molécules organiques en CO₂ (explication avancée pour expliquer la non-détection de molécules organiques — y compris celles attendues en conséquence du bombardement météoritique — par les sondes Viking), concluent que des acides carboxyliques, plus précisément des sels non-volatils d'acides benzèncarboxyliques, et peut-être de l'acide oxalique et de l'acide acétique, devraient être présents dans le sol martien en tant qu'intermédiaires métastables de l'oxydation des composés organiques météoritiques sous les conditions martiennes.

De l'acide formique (ou acide méthanoïque), le plus simple des acides carboxyliques, a été détecté dans la zone la plus aride du désert d'Atacama (un analogue de sol martien), milieu hostile à la vie (Navarro-González *et al.*, 2003).

Tous ces bioindices nous permettent d'obtenir un indice sur la présence potentielle d'une vie passée ou présente, mais ne nous permette pas de conclure avec certitude. En effet, leur origine n'est pas seulement biotique, mais peut aussi s'expliquer par une synthèse abiotique. Cependant, la présence simultanée de plusieurs bioindices nous donnerait une donnerait une forte présomption en faveur d'une présence de vie, et pourrait donc constituer un biomarqueur.

1.2.4.3) Matière organique complexe

Sur Terre, après la mort des organismes, la matière organique qui les constitue sédimente et est dégradée, pour former, entre autres, le kérogène, qui est un solide organique insoluble de nature mixte aromatique / aliphatique. Dans le milieu interstellaire (MIS), on observe, grâce aux observations radios, des émissions infrarouges non identifiées. Il a été proposé que certaines de ces émissions infrarouges non identifiées puissent être causées par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Allamandola *et al.*, 1985; Leger and Puget, 1984; dans Kwok and Zhang, 2011). Les HAP sont des molécules organiques apolaires qui contiennent au moins deux cycles benzène, pouvant être arrangés selon différentes configuration (National Research Council *et al.*, 1997). Cependant, parmi l'ensemble des molécules détectées dans le MIS, aucun HAP spécifique n'a été détecté de manière univoque (Öberg *et al.*, 2011; dans Gudipati and Yang, 2012; Pilleri *et al.*, 2009; dans Kwok and Zhang, 2011). Kwok et Zhang (2011) proposent que cette signature – qui ressemble à celle du charbon et du kérogène terrestre (Papoular, 2001, Papoular *et al.*, 1989, dans Kwok and Zhang, 2011) – serait plus probablement due à une matière organique complexe, sous forme de solides organiques amorphes à structure mixte aromatique - aliphatique ; structure similaire à celle de la matière organique insoluble (MOI) présente dans les météorites, dont nous parlerons dans le paragraphe 1.3.5). L'absence de signature de HAP spécifiques dans le MIS pourrait être due à la perte de leur signature spectroscopique suite à des réactions chimiques causées par les radiations (Gudipati and Yang, 2012). L'apparition de ces signatures non identifiées a été

observée au sein d'environnements circumstellaires d'objets dans les derniers stades de l'évolution stellaire, ce qui offre la possibilité que la MOI des météorites puisse avoir une origine interstellaire. Selon Kwok (2009), la matière organique complexe présente dans le système solaire présenterait de nombreuses similitudes avec la matière organique observée dans le milieu interstellaire, et il ne serait pas impossible que cette matière organique complexe (observée dans différents milieux, par exemple le CHON des comètes, la MOI des météorites, les HAP dans le milieu interstellaire, les tholins) partage des structures chimiques communes voire même des origines communes. Des HAP ont été détectés dans des météorites, par exemple dans des micrométéorites carbonées de l'Antarctique (Clemett *et al.*, 1998), dans la météorite martienne ALH84001 (McKay *et al.*, 1996) et dans Murchison (après hydrolyse de son matériel macromoléculaire insoluble, Sephton *et al.*, 2004). Ces composés complexes auraient donc pu représenter une source de molécules organiques sur la Terre primitive. De fortes abondances de PAH ont également été détectées dans la haute atmosphère de Titan (López-Puertas *et al.*, 2013).

1.2.5) Conclusion

La recherche de traces de vie passée ou présente dans les environnements extraterrestres nous permet d'obtenir des informations sur l'origine de la vie sur Terre et sur la possibilité d'une vie ailleurs, sous la forme de preuves (biomarqueurs), comme des fossiles, des structures sédimentaires d'origine minérale, des signatures isotopiques ou métaboliques, des biopolymères. A défaut d'en trouver des preuves, on peut en chercher des indices (bioindices), qui sont principalement les monomères (acides aminés, bases azotées, acides carboxyliques) des biopolymères. Ils peuvent être d'origine biotique ou abiotique. Mais où chercher ? Et comment ?

1.3) Où chercher : du milieu interstellaire au système solaire interne

Après avoir listé les biomarqueurs et les bioindices qu'il était intéressant de rechercher, il est maintenant utile de se pencher sur les lieux où ces traces de vie peuvent être détectées. Puisque l'on recherche en priorité une vie similaire à la nôtre, il est logique de lister

les milieux dans lesquels la vie telle qu'on la connaît aurait pu apparaître. Parmi toutes ces cibles, les premières se situent en dehors du système solaire, alors que les secondes le composent. Il s'agit en effet, des planètes, satellites et petits planétésimaux présents dans le système solaire. Nous privilégierons ici les cibles pour lesquelles l'analyse *in situ* est possible.

En dehors du système solaire, les cibles privilégiées sont essentiellement les exoplanètes possédant des conditions favorables à l'apparition de la vie telle qu'on la connaît : ce sont les analogues terrestres. Comme expliqué dans les chapitres précédents, ces analogues sont situés dans la zone d'habitabilité de leur étoile.

On cherche également des molécules organiques dans le milieu interstellaire. On estime en effet que lors de la formation des systèmes planétaires, les molécules organiques y sont déjà présentes. Ce sont ces molécules qui pourront alors être incorporées dans les comètes, les astéroïdes et leurs fragments, et ainsi apporter du matériel prébiotique indispensable à l'apparition de la vie sur les jeunes planètes.

Dans le système solaire, on recherche également dans la zone d'habitabilité, par exemple sur Mars, meilleure candidate à l'apparition de la vie, mais aussi sur certains satellites de géantes gazeuses, par exemple Titan, Europe, Encelade, Ganymède. On va aussi chercher au sein des comètes et des météorites, car on pense qu'elles ont apporté de nombreuses molécules organiques sur Mars et sur la Terre primitive.

1.3.1) Le milieu interstellaire et les milieux circumstellaires

1.3.1.1) Observations

Les observations radio des milieux interstellaire et circumstellaires ont mené à la découverte de plus de 140 molécules en phase gazeuse (Kwok, 2009; Kwok and Zhang, 2011). Cela inclut des hydrocarbures, des alcools, des acides carboxyliques, des aldéhydes, des cétones, des amines, et des éthers. Certaines sont des molécules prébiotiques. C'est le cas du glycolaldéhyde (dont la structure est proche de celle des oses) (Hollis *et al.*, 2000), récemment détecté autour d'une proto-étoile binaire (Jørgensen *et al.*, 2012). Cette molécule, précurseur du ribose (bloc constitutif de l'ARN), est considérée comme le plus simple des sucres. La présence de cette molécule est donc la preuve que des processus menant à l'apparition de

molécules indispensables à la vie telle que nous la connaissons sur Terre prennent place hors du système solaire. La glycine (pouvant jouer le rôle de précurseur des bases azotées, présentes dans les acides nucléiques) a été détectée dans le MIS (Kuan *et al.*, 2003a), cependant ce résultat a été remis en question par la suite (Snyder *et al.*, 2005). La pyrimidine (également un précurseur de bases azotées) est également recherchée, mais sa détection n'a pas encore été confirmée (Kuan *et al.*, 2003b). Certaines observations spectroscopiques ont été attribuées, sans confirmation, à des molécules telles que des HAP, fullerènes, nanotubes, carbone amorphe hydrogéné (« hydrogenated amorphous carbon », HAC), « quenched carbonaceous composites » (QCC), C60, et réseaux aromatiques complexes similaires au kérogène (Ehrenfreund and Charnley, 2000; Kwok, 2009).

Comme précisé au paragraphe 1.2.4.3), certaines émissions infrarouges non identifiées, apparaissant notamment dans l'environnement circumstellaire d'étoiles dans leurs stades tardifs d'évolution stellaire, ont été par le passé considérées comme possiblement attribuables aux HAP, bien qu'aucun HAP spécifique n'ait été détecté dans l'espace. Kwok and Zhang (2011) ont proposé que ces signatures pouvaient être expliquées par la présence d'un mélange de nanoparticules organiques, des solides organiques amorphes de structure mixte aromatique-aliphatique. Or cette structure mixte aromatique-aliphatique est similaire à celle de la MOI trouvée dans les chondrites carbonées. Les auteurs supposent qu'il serait logique que ces structures coïncident dans le cas où le système solaire (et donc les chondrites carbonées) auraient hérité cette matière organique du milieu interstellaire (Kwok and Zhang, 2011).

1.3.1.2) Simulations

L'observation du milieu interstellaire a mis en évidence la présence de glaces interstellaires solides sur la surface de poussières carbonées ou silicatées froides. En laboratoire, des analogues de ces glaces interstellaires sont soumis à des irradiations UV à de faibles températures. Cela conduit à la production d'un résidu organique réfractaire, stable à température ambiante, contenant une grande variété de composés organiques (Meierhenrich *et al.*, 2005), dont des acides aminés, détectés après hydrolyse acide (Bernstein *et al.*, 2002; Muñoz Caro *et al.*, 2002). Les acides aminés, blocs constitutifs des protéines, ainsi que d'autres

molécules prébiotiques, pourraient donc être d'origine extraterrestre et se former dans le milieu interstellaire. Ces résultats vont dans le sens de l'origine extraterrestre des molécules prébiotiques apportées à la terre primitive, par le biais des comètes (il est supposé que les comètes sont constituées de matériel interstellaire primitif (Greenberg, 1982; Irvine *et al.*, 2000), ainsi que des astéroïdes (et leurs fragments, les météorites) et des poussières interplanétaires. Ces différents moyens auraient ainsi pu apporter à la terre primitive les molécules nécessaires à l'apparition de la vie. Cependant, dans les analogues de glaces interstellaires irradiées, les acides aminés sont détectés seulement après hydrolyse acide. Dans une étude de Bernstein *et al.* (2002), lors de l'hydrolyse acide, l'abondance de molécules précurseurs (la N-formyl glycine et la cyclosérine), détectées avant l'hydrolyse acide, déclinent en même temps que l'augmentation de l'abondance de la glycine et la sérine. La formation des acides aminés nécessiterait donc peut-être un chauffage de la glace, suite à la formation de molécules organiques précurseurs par irradiation UV de cette glace dans le milieu interstellaire.

Comme précisé au paragraphe 1.2.4.3), bien que les fréquences vibrationnelles et rotationnelles des HAP soient bien connues, aucun HAP n'a jamais été identifié dans l'espace (Öberg *et al.*, 2011; Pilleri *et al.*, 2009). Gudipati et Yang (2012) ont donc soumis des analogues de glaces interstellaires, contenant des HAP, aux conditions du milieu interstellaire. Ils ont montré qu'une fois accrétés à la glace, les HAP perdaient leur signature spectroscopique suite à des réactions chimiques causées par les radiations. Cela pourrait être une des raisons pour lesquelles les HAP n'ont jamais été détectés dans l'espace. Au sein des glaces, ces HAP pourraient être transformés en hydrocarbures non aromatiques hydroxylés et hydrogénés.

De nombreuses molécules organiques ont été détectées dans le milieu interstellaire. Le MIS pourrait donc être la source de matériel prébiotique, présent lors de la formation du système solaire, et apporté sur les jeunes planètes (par exemple par les météorites et les comètes), permettant l'apparition de la vie. Nous allons maintenant nous intéresser à la recherche de bioindices dans le système solaire, à commencer par les satellites de géantes gazeuses. En effet, malgré le fait qu'elles soient situées hors de la zone d'habitabilité du Soleil, elles sont néanmoins des objets d'intérêt biologique certain.

1.3.2) Satellites de géantes gazeuses

1.3.2.1) Titan

Titan est la plus grande lune de Saturne et représente un laboratoire naturel pour l'étude de la formation de molécules organiques. Il est principalement constitué de glace d'eau et de roches. Il possède une atmosphère dense, constituée principalement d'azote, et un cycle «hydrologique» basé sur le méthane liquide (Stofan *et al.*, 2007), ce qui représente une analogie avec le cycle de l'eau sur Terre, bien qu'à des températures beaucoup plus faibles. Une chimie organique y prend place, incluant des composés clefs de la chimie prébiotique.

En effet, la basse atmosphère de Titan contient des particules organiques sous forme d'aérosols (nommés tholins lors des simulations en laboratoire), présumément formés à partir de molécules simples, telles que le méthane ou le diazote. Des données spectrométriques obtenues par l'orbiteur Cassini ont permis de mettre en évidence la formation de tholins à de hautes altitudes (~1000 km), c'est-à-dire dans la haute atmosphère de Titan. Les observations vont dans le sens d'une série de réaction chimiques et de processus physiques, partant des molécules simples citées plus avant (CH_4 , N_2), menant à des molécules plus complexes (80 à 350 daltons), et à des macromolécules chargées négativement (~8000 daltons), les tholins (Waite *et al.*, 2007). Des modèles de la chimie se déroulant dans la haute atmosphère de Titan sont développés (*e.g.*, Carrasco *et al.*, 2008). Plus récemment, du propène (C_3H_6) a été détecté dans la stratosphère (*i.e.* dans la basse atmosphère) (Nixon *et al.*, 2013), et de fortes abondances de PAH ont été détectées dans la haute atmosphère (López-Puertas *et al.*, 2013).

Bien qu'en surface, l'absence d'eau liquide et la faible température (la sonde Huygens a mesuré une température de surface de $-179,5^\circ\text{C}$; *cf.* Fulchignoni *et al.*, 2005) soient des facteurs limitants pour l'apparition et le maintien de la vie telle que nous la connaissons, la présence de cette dernière y a été envisagée (McKay and Smith, 2005). De plus, un océan existe potentiellement sous la surface, possiblement constitué d'eau et d'ammoniaque liquide (Iess *et al.*, 2012; Mitri *et al.*, 2014). La vie pourrait également y être présente (Fortes, 2000).

1.3.2.2) Europe

Europe est un satellite de Jupiter. Il possède une structure interne différenciée, incluant un noyau dense métallique, un manteau rocheux, et une croûte de glace d'eau de faible densité, avec la présence possible d'un océan d'eau saumâtre (d'une épaisseur de 80 – 170 km) sous cette croûte (Anderson *et al.*, 1998; Kivelson *et al.*, 2000; Pappalardo *et al.*, 1999; Stevenson, 2000). Dans le cas où la vie pourrait apparaître en profondeur, alors l'océan d'Europe pourrait constituer un habitat pour l'apparition et le maintien de la vie. Dans le cas où Europe aurait une composition similaire aux chondrites carbonées (Kargel, 1991), les molécules prébiotiques auraient été présentes en abondance. Les impacts cométaires au cours de l'histoire du système solaire auraient également pu apporter à Europe des molécules organiques (Chyba and Phillips, 2001). Une hypothétique photosynthèse sur Europe est toutefois peu probable en dessous de la croûte de glace. Cependant, une source d'énergie autre que l'énergie solaire pourrait permettre l'apparition de la vie sur Europe, par exemple au niveau des événements hydrothermaux au fond de l'océan.

Des observations d'émissions UV réalisées par le télescope spatial Hubble en décembre 2012 ont permis de mettre en évidence des émissions coïncidentes, attribuées à l'hydrogène et l'oxygène, au-dessus de l'hémisphère sud de Titan. Ces dernières sont consistantes avec des panaches de vapeur d'eau d'une hauteur de 200 km. Ces émissions ont été constamment observées dans la même zone, au cours de sept heures d'observation. Leur non-détection lors de précédentes observations (en 1999 et novembre 2012) suggère une variation dans l'activité de ces panaches, qui pourrait dépendre des phases orbitales d'Europe (Roth *et al.*, 2014). Les potentiels panaches d'Europe pourraient représenter des cibles intéressantes d'un point de vue exobiologique, dans le cas où elles contiendraient des indices ou des preuves de vie. Cela a été le sujet d'un workshop qui s'est déroulé à la NASA Ames Research Center en 2015 (Fletcher, 2015).

Une mission est en cours de développement à destination d'Europe, la mission « Europa Clipper », dans le but d'investiguer son habitabilité. Cette mission consisterait à placer un vaisseau en orbite de Jupiter, qui réaliserait des proches survols d'Europe à des latitudes et longitudes variées. Les objectifs scientifiques sont de caractériser (i) la croûte de glace et l'océan, (ii) la composition de l'océan, et (iii) la géologie, à travers la compréhension de la formation des structures de surface. Les implications de la détection de

possibles panaches par le télescope spatial Hubble sont également considérées (Pappalardo *et al.*, 2015).

1.3.2.3) Autres satellites

D'autres satellites de géantes gazeuses présentent un intérêt en exobiologie, comme Encelade (satellite de Jupiter) qui possède des panaches constitués majoritairement d'eau (et contenant des molécules organiques à l'état de traces, *cf.* Waite *et al.*, 2006), suggérant la possibilité d'un océan d'eau liquide sous sa croûte de glace d'eau (Postberg *et al.*, 2009). Ganymède (satellite de Jupiter) est également un bon candidat, puisque certains modèles suggèrent la présence d'eau liquide en subsurface (Kivelson *et al.*, 2002; Moore and Schubert, 2003). Des observations spectroscopiques à l'aide du Visible-Infrared Mapping Spectrometer (VIMS) sur Cassini ont montré la présence d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques sur les satellites Saturniens Japet, Phoebe et Hyperion (Cruikshank *et al.*, 2008).

1.3.3) Comètes

Les comètes sont constituées d'un noyau, composé d'un mélange de glaces et de poussière, aussi qualifié de « boule de neige sale » (Whipple, 1950). Le matériel constituant les noyaux cométaires est resté relativement non-altéré depuis l'accrétion des comètes lors de la formation du système solaire. Les comètes sont donc un moyen d'obtenir de l'information sur cette époque, car elles peuvent être constituées d'échantillons préservés du matériel à partir duquel le système solaire s'est formé. Les glaces cométaires sont principalement constituées d'eau, mélangées avec de petites quantités d'autres espèces, comme par exemple le méthanol CH_3OH , le monoxyde de carbone CO et le dioxyde de carbone CO_2 . Les poussières sont faites de matière organique ou de silicates (Despois and Cottin, 2005). Lorsqu'elle s'approche du Soleil, une comète entre dans sa phase active : la *coma*, ou chevelure (un halo sphérique de gaz neutres et de poussières), ainsi qu'un nuage d'hydrogène atomique, se développent autour du noyau. Une queue de plasma est produite par l'interaction entre le vent solaire et les ions produits dans le coma. Une queue de poussières (précédemment relâchées par le noyau) apparaît également.

Grâce aux observations spectroscopiques, de la glace d'eau, ainsi que de nombreuses molécules organiques volatiles ont été découvertes dans les comètes : monoxyde de carbone CO, méthanol CH₃OH, méthane CH₄, acétylène C₂H₂, éthane C₂H₆, oxysulfure de carbone OCS, cyanure d'hydrogène HCN, ammoniacque NH₃, formaldéhyde H₂CO (Mumma *et al.*, 2003, 2001).

La composition des poussières a été analysée *in situ* par spectrométrie de masse à temps de vol grâce aux instruments des sonde Vega 1, Vega 2, et Giotto, lors de leur passage près de la comète 1/P Halley en 1986 (Kissel *et al.*, 1986a, 1986b; Kissel and Krueger, 1987; Krueger and Kissel, 1987). Lorsque les grains sont éjectés du noyau, la glace présente est sublimée. Il ne reste donc que la matière réfractaire (non-volatile). Ces particules sont faites d'un mélange de silicates et de matériel organique. Lorsque la matière organique est très abondante, les grains sont appelés « CHON » (c'est-à-dire des composés comprenant du C, H, O et N). A partir des spectres de masse obtenus, la présence de certaines molécules organiques peut être supposée : des polymères (polyoxyméthylène POM et poly-HCN), des grains de carbone pur, des HAP, des hydrocarbures aliphatiques. Cependant, ces prédictions doivent être confirmées par des observations spectroscopiques. Cf. Despois and Cottin (2005) pour une liste exhaustive de ces molécules.

Des particules éjectées par la comète 81P/Wild2 ont été collectées par la sonde Stardust, et les échantillons ont été rapportés sur Terre. Une grande diversité de matériel organique a été trouvée. Certaines molécules organiques sont similaires, mais pas identiques, à celles présentes au sein des particules de poussières interplanétaires et des chondrites carbonées. Du matériel organique pauvre en aromatiques est aussi présent. Le matériel organique est riche en oxygène et en azote comparé aux molécules organiques présentes dans les météorites. Des composés aromatiques sont présents, mais les échantillons collectés sont plus pauvres en aromatiques que les météorites et les particules de poussière interplanétaires. La détection d'excès en deutérium et ¹⁵N suggère que certaines molécules puissent être d'origine interstellaire/protostellaire (Sandford *et al.*, 2006). La présence de glycine, le plus simple des acides aminés, a été confirmée dans les échantillons de 81P/Wild2 (Elsila *et al.*, 2009). Il a également été montré que les impacts des comètes sur des surfaces

rocheuses (et inversement, l'impact de corps rocheux sur des surfaces glaciaires, comme les satellites des géantes gazeuses) pourraient avoir été responsables de la production de molécules organiques complexes, dont des acides aminés. En effet, Martins *et al.* (2013), après avoir impacté des analogues de glaces cométaires, ont observé la formation d'acides aminés, dont l'alanine (en mélange racémique), l'acide alpha-AminolisoButyrique (AIB) et l'isovaline, ainsi que leurs précurseurs. Les impacts cométaires sur la Terre primitive auraient donc pu représenter une source de plus pour la production des blocs constitutifs du vivant.

La mission Rosetta, constituée d'un orbiteur et d'un atterrisseur, a pour objectif l'étude de la comète 67P/Tchourioumov-Guerassimenko. A bord de l'atterrisseur Philae, l'instrument « Cometary Sampling and Composition » (COSAC) est constitué d'un CPG et d'un spectromètre de masse à temps de vol (« Time-Of-Flight ») (TOF-MS), et peut analyser des échantillons délivrés par le système de forage et de distribution (« Sample Drilling and Distribution System », SD2). COSAC est également capable de fonctionner en « sniffing mode », c'est-à-dire en analysant les molécules entrées passivement dans l'instrument, sans échantillonnage par le SD2. Ce dernier mode a permis la détection de 16 composés organiques, dont de nombreuses espèces comportant de l'azote, mais aucune espèce comportant du soufre. Quatre molécules organiques ont été détectées pour la première fois au sein d'une comète : l'isocyanate de méthyle, l'acétone, le propanal (ou « propionaldehyde » en anglais) et l'acétamide (Goesmann *et al.*, 2015).

Les poussières éjectées par les comètes représentent une part des poussières interplanétaires tombant sur Terre, et auraient donc pu contribuer à l'apport de matériel organique, nécessaire à l'apparition de la vie (Chyba and Sagan, 1992) (Figure I-9).

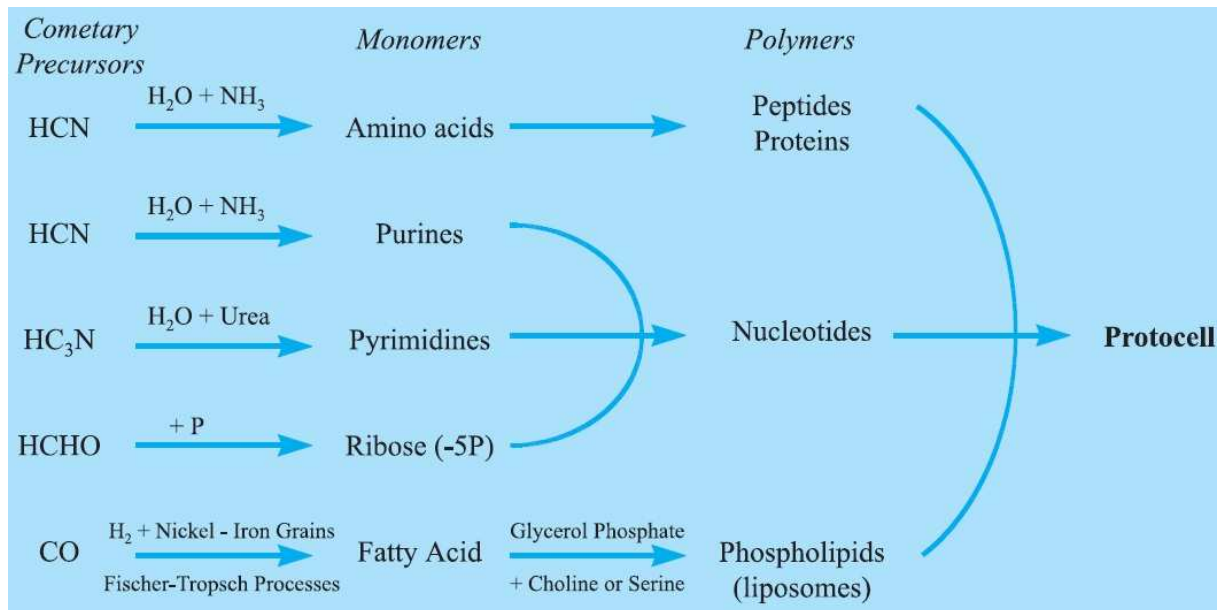


Figure I-9 : synthèse prébiotique à partir de molécules d'origine cométaire (dans Despois and Cottin, 2005)

1.3.4) Poussières interplanétaires

Les météoroïdes sont des corps de petite taille errant dans l'espace interplanétaire. Les plus petits sont appelés poussières interplanétaires. Lors de leur chute sur Terre, les météoroïdes prennent le nom de météorites pour les plus grands, et de micrométéorites pour les plus petits. Les poussières interplanétaires génèrent des micrométéorites.

Les poussières interplanétaires possèdent deux sources : les comètes (les gaz produits par la sublimation de leurs glaces entraînent des poussières qui sont relâchées dans le milieu interplanétaire), et les collisions entre objets rocheux (astéroïdes et fragments d'astéroïdes).

Les micrométéorites représentent une contribution majeure à l'apport de matière – et spécialement de molécules organiques – à la Terre. Ils peuvent même être considérés comme de petits réacteurs chimiques prébiotiques, puisqu'ils contiennent beaucoup de composés prébiotiques significatifs, incluant des argiles (rôle de catalyseur), et procurant un conteneur naturel permettant d'éviter la dilution des réactifs (Maurette, 1998; Maurette *et al.*, 2000).

1.3.5) Les météorites

Les météorites sont des corps solides naturels d'origine extraterrestre qui tombent à la surface de la Terre. Il existe au moins 45 types différents de météorites (Weisberg *et al.*, 2006). La plupart sont des fragments d'astéroïdes. Ces astéroïdes se sont formés au sein de la nébuleuse proto-solaire, en même temps que le reste du système solaire, au cours d'un processus appelé accréation. Les météorites peuvent donc nous renseigner sur les processus chimiques survenus à l'époque où le système solaire était encore jeune, avant que la vie n'apparaisse sur terre. Les chondrites carbonées, notamment, qui sont les plus primitives et aussi les plus riches en molécules organiques solubles, auraient pu représenter une source importante de molécules prébiotiques nécessaires à l'apparition de la vie sur la Terre primitive (Chyba and Sagan, 1992). Les chondrites carbonées sont classées selon leurs caractéristiques primaires et secondaires. La classification primaire (CI, CM, CR, CO, CV, CK) reflète le type chimique, c'est-à-dire les propriétés chimiques et minéralogiques. Les lettres proviennent de la météorite acceptée en tant que spécimen type, par exemple CI pour Ivuna. La classification secondaire reflète le type pétrographique, qui indique le degré et le type d'altération que la météorite a subi sur le corps parent. Elle est indiquée par un chiffre de 1 (altération aqueuse) à 6 (métamorphisme thermique).

Le carbone représente 2 à 5% du poids des chondrites carbonées, et il est pour la plus grande partie présent en tant que matière organique (Sephton *et al.*, 2004). Cette matière organique peut être divisée en deux phases :

- La matière organique « libre », qui peut être isolée par extraction par des solvants communs, et qui représente environ 30% de la matière organique dans les météorites CI1 et CM2 (Sephton, 2002). Elle est constitué d'un mélange complexe de molécules organiques, dont des acides carboxyliques, acides aminés, hydrocarbures aromatiques, hydrocarbures aliphatiques, amines, amides, alcools, aldéhydes, cétones, sucres, acides sulfoniques, acides phosphoniques, hétérocycles azotés (dont les bases azotées adénine, guanine, thymine, cytosine, uracile, xanthine, hypoxanthine), et hétérocycles soufrés (Kwok, 2009; Sephton, 2002). Les hydrocarbures aromatiques représentent la part la plus importante des composés organiques solubles, suivi par les acides carboxyliques (Botta et Bada, 2002 ; dans Kwok, 2009).

- Le reste de la matière organique (environ 70%) est sous la forme d'une macromolécule insoluble à structure complexe, similaire au kérogène terrestre (Cody and Alexander, 2005; Sephton *et al.*, 2000; dans Glavin *et al.*, 2010) (Kerridge, 1999 ; dans Kwok, 2009). Cette matière organique macromoléculaire est insoluble dans les solvants organiques communs (Sephton, 2002) et est également connue sous le nom de MOI (Cronin *et al.*, 1987 ; dans Kwok, 2009). Ce solide organique complexe est composé de groupes fonctionnels aromatiques et aliphatiques, et de groupes fonctionnels contenant de l'oxygène (Kwok, 2009).

Le reste du carbone est inorganique, présent par exemple sous la forme de carbonates ou de carbone « exotique » (diamant, carbure de silicium, graphite).

Sur la base d'observations radios, il a été supposé que le MIS diffus contenait de la matière organique similaire à la MOI des météorites (Ehrenfreund *et al.*, 1991; Pendleton and Allamandola, 2002; dans Kwok, 2009). Une analyse récente de la MOI dans la météorite Murchison suggère que sa structure chimique est très similaire à la structure de la matière complexe proposée par Kwok et Zhang (2011) pour expliquer certaines émissions infrarouges non identifiées dans le MIS (Cody *et al.*, 2011; Derenne et Robert, 2010; dans Kwok and Zhang, 2011) (*cf.* paragraphe 1.2.4.3). La présence de MOI dans les météorites montre que de la matière organique complexe sous forme solide peut se former par des processus abiotiques. Le fait que la MOI des météorites et la matière organique complexe proposée par Kwok et Zhang (2011) comme potentielle responsable de certaines émissions infrarouges non identifiées dans le MIS possèdent des structures similaires ouvre la possibilité que la matière organique présente dans le système solaire, et apportée sur la Terre primitive, puisse avoir une origine interstellaire (Kwok and Zhang, 2011).

Plus de 80 acides aminés, comportant de 2 à 9 carbones, ont été identifiés dans les chondrites carbonées, dans des quantités allant de 300 ppm à environ 1 ppm (Burton *et al.*, 2012b) (pour une liste exhaustive, *cf.* Burton *et al.*, 2012b, tableau 2). Il existe 8 groupes de chondrites carbonées, dont 5 contiennent des acides aminés. Les CM (par exemple Murchison, qui contient entre autres de la glycine et de l'alpha-AminoIsoButyric acid (AIB)) et CR contiennent majoritairement des acides alpha-aminés, alors que les trois autres groupes (CI, CV et CO) ont des distributions structurales très différentes, ce qui implique différentes voies de formations au sein des corps parents des météorites. Généralement, le métamorphisme

thermique et l'altération aqueuse subie par les astéroïdes suite à leur accréation est corrélée aux variations en abondance et en distributions isomériques des acides aminés. Ces altérations ont donc influencé la nature des composés prébiotiques délivrés à la Terre primitive par les météorites. Il a été montré que les abondances totales en acides aminés sont les plus fortes dans les chondrites les moins altérées, CR2 et CR3 (environ 80 à 300 ppm), et sont significativement plus faibles (environ 0.7 à 7 ppm) dans les CI, CM et CR1 (Glavin *et al.*, 2010; dans Burton *et al.*, 2012b), ayant subi plus d'altération aqueuse, ainsi que dans les CO et CV, thermiquement altérées (Burton *et al.*, 2012a ; *cf.* également le tableau 1 dans Burton *et al.*, 2012b). Afin de déterminer leur contenu en acides aminés, la matière organique est extraite à l'eau, puis une hydrolyse acide est réalisée sur cet extrait.

1.3.6) Mars

1.3.6.1) Introduction

Située entre la Terre et Jupiter, Mars, notre plus proche voisin planétaire, est la quatrième planète du système solaire, par ordre de distance croissante au Soleil.

C'est une planète tellurique qui ne possède quasiment plus d'activité géologique interne (bien qu'une activité volcanique récente à l'échelle des temps géologiques, c'est-à-dire datant d'il y a 2 millions d'années ait été détectée, *cf.* Neukum *et al.*, 2004).

Différents moyens de mesure ont permis, tout au long de l'exploration de Mars, de déduire la composition de sa basse atmosphère comme étant la suivante : CO₂ (95,32%), N₂ (2,7%), argon 40 (1,6%), O₂ (0,13%) et CO (0,07%). Cette dernière, tenue, comporte également des traces d'eau, d'argon 36 et 38, de néon, de krypton, de xénon, d'azote, d'H₂O₂ et de CH₄ (Encrenaz, 2001, Owen, 1992; dans Encrenaz *et al.*, 2004b).

Plus récemment, des mesures multiples réalisées par l'instrument SAM sur le rover Curiosity, lors des 105 premiers sols suivant son atterrissage, ont permis de déduire la composition atmosphérique suivante : CO₂ (96%), argon 40 (1,93%), N₂ (1,89%), O₂ (0,145%), CO (<0,1%) (Mahaffy *et al.*, 2013).

1.3.6.2) Chronologie des temps géologiques martiens

L'accrétion et la différenciation de Mars se sont déroulées il y a environ 4,5 Ga, seulement quelques dizaines de millions d'années après la formation du système solaire. Les structures de la surface martienne ont permis, en se basant sur les relations d'intersection et le nombre de cratères d'impact superposés, de diviser l'histoire géologique de Mars en trois ères : le Noachien (de -4,1/-3,8 Ga à environ -3,7 Ga), nommé à partir de la région fortement cratérisée de Noachis Terra ; l'Hespérien (d'environ -3,7 Ga à -3,3/-2,9 Ga), nommé à partir d'Hesperia Planum ; et l'Amazonien (de -3,3/-2,9 Ga jusqu'aujourd'hui), nommé à partir de la plus jeune Amazonis Planitia (Carr and Head III, 2010). L'ensemble des lieux énoncés dans cette partie sont indiqués sur la carte de Mars en annexe.

Le pré-Noachien était caractérisé par un champ magnétique, et sujet à de nombreux impacts générateurs de bassins. Le Noachien était caractérisé par un fort taux de cratérisation, d'érosion, et de formation de vallées (Figure I-16). C'est pendant cette période que s'est formée la plus grande partie de Tharsis. Les conditions chaudes et humides, nécessaires à l'activité fluviale, étaient rencontrées occasionnellement, comme par exemple lors de grands impacts ou d'éruptions volcaniques. A la fin du Noachien, les taux d'impact, de formation de vallées, de météorisation, et d'érosion, chutèrent tous rapidement, mais le volcanisme continua à un taux moyen relativement haut au travers de l'Hespérien, résultant en un resurfaçage d'au moins 30% de la planète. De grands épanchements d'eau eurent lieu épisodiquement, en formant des chenaux d'écoulement (Figure I-17) et possiblement de grandes étendues d'eau. Le changement à la fin du Noachien supprima la plus grande partie de l'activité aqueuse à la surface, mis à part les grands épanchements d'eau, et résultat en la croissance d'une épaisse cryosphère. Cependant, la présence occasionnelle de réseaux de vallées, datant de l'Hespérien, indiquent que l'activité hydrique ne disparut pas complètement. Après la fin de l'Hespérien, la vitesse de l'activité volcanique ralentit encore. Le taux moyen de volcanisme pendant l'Amazonien était approximativement 10 fois moins élevé qu'au cours de l'Hespérien, et l'activité confinée largement à Tharsis et Elysium. La principale ère d'épanchements d'eau était terminée, bien que de petits épanchements se produisirent épisodiquement, jusqu'à des temps géologiques récents. Les taux d'érosion et de météorisation restèrent extrêmement bas. La caractéristique la plus remarquable de l'Amazonien est la formation de structures qui ont été attribuées à la présence,

l'accumulation, et le mouvement de glaces. L'erreur au niveau de la date de la fin du Noachien est probablement minime, mais la date de la limite entre l'Hespérien et l'Amazonien pourrait incorporer une erreur significative (en effet, la datation des terrains plus jeunes [<1 Ga] est moins certaine, à cause de la distribution non-uniforme des cratères secondaires, et la possibilité d'un déclin du taux d'impact sur le long terme) (Carr and Head III, 2010).

1.3.6.3) Géologie et minéralogie martienne

Mars possède une surface complexe, et son régolithe (par définition, la couche la plus superficielle de la surface d'une planète, composée de blocs rocheux non-consolidés et de particules de poussière, résultant du bombardement météoritique) ne représente pas seulement la couche superficielle de poussières recouvrant la surface, mais aussi les horizons sous-jacents, des roches partiellement altérées à la roche mère originelle. Ainsi, la caractérisation du régolithe martien implique non seulement les roches primaires, mais aussi les minéraux produits par les différents processus ayant lieu à la surface, c'est-à-dire la météorisation par l'eau, ainsi que – de manière locale dans le temps et l'espace – d'autres processus tels que l'hydrothermalisme, le volcanisme, l'évaporation, les impacts météoritiques et l'érosion éolienne (Chevrier and Mathé, 2007). De nombreuses mesures ont été réalisées au cours du temps, afin d'obtenir des informations sur la minéralogie martienne, par les différents orbiteurs (Mariner 9, les orbiteurs Viking, Phobos 2, Mars Global Surveyor [MGS], Mars Odyssey, Mars Express, Mars Reconnaissance Orbiter), atterrisseurs (Viking 1 et 2, Mars Pathfinder, Pheonix) et rovers (Sojourner, le rover de l'atterrisseur Mars Pathfinder ; Mars Exploration Rovers [MER] Spirit et Opportunity ; Curiosity). Des découvertes importantes ont été réalisées, telles que l'observation d'une dichotomie crustale globale, de minéraux produits par l'altération aqueuse, et du caractère oxydant du sol martien. Suite à des observations réalisées par l'instrument OMEGA (Observatoire pour la Minéralogie, l'Eau, les Glaces et l'Activité), une nouvelle chronologie des temps géologiques martiens (basée sur la nature des minéraux détectés) été proposée, complétant la chronologie déjà en place (*i.e.* Noachien – Hespérien – Amazonien).

a) Dichotomie crustale

Sur Mars, il existe une dichotomie entre les hauts plateaux de l'hémisphère Sud, de couleur sombre, surtout formés de terrains cratérisés, et les grandes plaines du Nord, de couleur plus claire et peu cratérisés (Figure I-12, Figure I-13). Cette dichotomie pourrait être le produit d'un impact au cours du pré-Noachien (Carr and Head III, 2010).

Hauts plateaux du sud et silicates primaires

Les plateaux cratérisés (comprenant par exemple le cratère Gusev ou encore Hellas Planitia) et globalement sombres (albédo inférieur à 0,2 : figure I-13), n'ont pas subi d'altération minéralogique majeure et globale depuis plus de 4 Ga. Ils sont constitués des minéraux de la croûte initiale : les silicates (Bibring and Langevin, 2006).

Les silicates sont les minéraux les plus abondants à la surface des planètes telluriques du système solaire. Ce sont des minéraux dont l'élément de base est le groupement SiO_4^{4-} . Le polyèdre de coordination (groupement géométrique des anions autour des cations dans un minéral) le plus fréquent est le tétraèdre (Figure I-10). Dans celui-ci, l'ion Si^{4+} est entouré de quatre O^{2-} . Selon le mode d'assemblage des tétraèdres, on distingue plusieurs cas à la base de la classification des minéraux silicatés, classification incluant par exemple les tectosilicates, néosilicates, inosilicates, ou phyllosilicates. Sur Terre, les minéraux silicatés représentent 95% des constituants de l'écorce terrestre et quasiment 100% des constituants du manteau. Sur Mars, la paragenèse (assemblage de minéraux associés dans le temps et l'espace, et résultant d'un même processus physico-chimique) silicatée primaire est de composition basaltique à andésitique (Chevrier and Mathé, 2007). Le basalte est une roche magmatique (ou ignée, c'est-à-dire résultant du refroidissement d'un magma) extrusive (refroidissement et donc cristallisation rapide en surface, formant de petits cristaux). Il existe quatre types d'assemblages minéralogiques (ultramafique, mafique, intermédiaire et felsique) résultant de la cristallisation fractionnée des silicates dans un magma (cela est dû au fait que les cristaux ne se forment pas tous en même temps, les premiers à cristalliser étant les minéraux de haute température). Le basalte résulte du refroidissement d'un magma mafique (et est par conséquent riche en pyroxènes et en feldspaths plagioclases calciques, avec possiblement une petite quantité d'olivine ou d'amphiboles). L'andésite, également une roche ignée extrusive, résulte du refroidissement d'un magma intermédiaire (et est par conséquent composés

d'amphiboles et de feldspaths plagioclases dont le contenu en calcium et sodium est intermédiaire entre les deux pôles, avec possiblement un peu de quartz et de biotite).

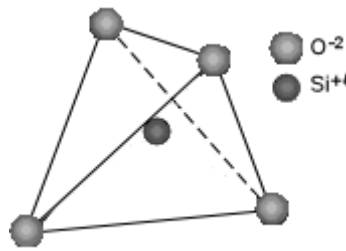


Figure I-10: le tétraèdre SiO_4^{4-} , élément de base des silicates (source : Université de Tulane)

Cette composition basaltique à andésitique de la surface martienne a été déduite à partir d'observations orbitales réalisées par les sondes MGS et Mars Odyssey, d'analyses *in situ* réalisées par les atterrisseurs Viking et Mars Pathfinder, et d'études de météorites de la classe SNC (acronyme de « Shergottites, Nakhilites, Chassignites » ; classe de météorites considérées comme provenant de Mars, *cf.* Treiman et al., 2000). Les principaux silicates observés sur la surface sont le pyroxène, l'olivine et le plagioclase, même si des minéraux quartzo-feldspathiques riches en silice ont été mis en évidence et semblent indiquer que la différenciation magmatique ait été plus importante que ce qui était pensé auparavant. L'olivine, le pyroxène et le plagioclase ont été identifiés et cartographiés par MGS-TES (Mars Global Surveyor - Thermal Emission Spectrometer), l'instrument THEMIS (Thermal Emission Imaging System) de Mars Odyssey, et l'instrument OMEGA de Mars Express. De l'olivine et du pyroxène ont également été observés *in situ* par les spectromètres mini-TES et Mössbauer sur les MER (Chevrier and Mathé, 2007).

Ainsi, les hauts plateaux du sud montrent une forte abondance en pyroxène (Bibring *et al.*, 2006; Mustard *et al.*, 2005), un inosilicate, et constituant important des laves basaltiques. Les inosilicates sont des silicates dont les tétraèdres sont disposés en chaînes. Chaque tétraèdre partage deux sommets avec ses voisins. Dans le cas des pyroxènes, les chaînes sont simples et la formule générale est $(\text{SiO}_3)^{2-}$ ou $(\text{Si}_2\text{O}_6)^{4-}$ (Figure I-11). Les charges négatives sont neutralisées par des cations. La nature de ceux-ci détermine la nature du pyroxène. Lorsque les cations intervenant sont Fe^{2+} et Mg^{2+} , on parle d'orthopyroxène, de formule approchée $(\text{Fe,Mg})_x(\text{SiO}_3)$. Lorsque les cations intervenant sont plus variés (*e.g.* Na,

Ca, Al), on parle de clinopyroxène, de formule approchée $(\text{Na,Ca,Al,Mg})_x(\text{SiO}_3)$. De l'olivine est également présente dans les hauts plateaux du Sud (Bibring *et al.*, 2006; Mustard *et al.*, 2005). L'olivine, également un silicate constitutif des roches basaltiques, est un nésosilicate. Dans les nésosilicates, les tétraèdres ne sont pas liés les uns aux autres par leurs atomes O (sommets). Leur formule globale est donc $(\text{SiO}_4)^{4-}$. Chez les olivines, les charges négatives sont neutralisées par Fe^{2+} ou Mg^{2+} (ces deux ions ont le même rayon et peuvent ainsi facilement se substituer entre les tétraèdres). Ces cations permettent la réunion des différents tétraèdres. La formule des olivines est $(\text{Fe,Mg})_2(\text{SiO}_4)$.

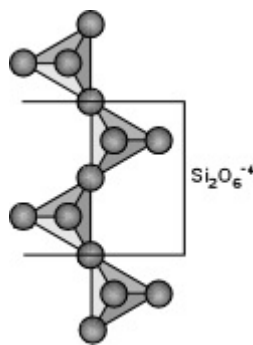


Figure I-11: Structure d'un pyroxène (source : Université de Tulane)

Le Fe-pyroxène détecté par OMEGA est le minéral le plus largement distribué sur Mars. Du « high-calcium pyroxène » (HCP) et du « low-calcium pyroxène » (LCP) ont été identifiés par l'instrument. Les régions riches en LCP sont situées dans la croûte Noachienne. Les régions riches en HCP sont situées dans les coulées de lave plus récentes. L'olivine est détectée dans les terrains riches en pyroxène, ou dans des zones localisées au sein desquelles elle domine, principalement au sein de bordures et de sols de cratères, et à proximité de larges bassins d'impact (Mustard *et al.*, 2005).

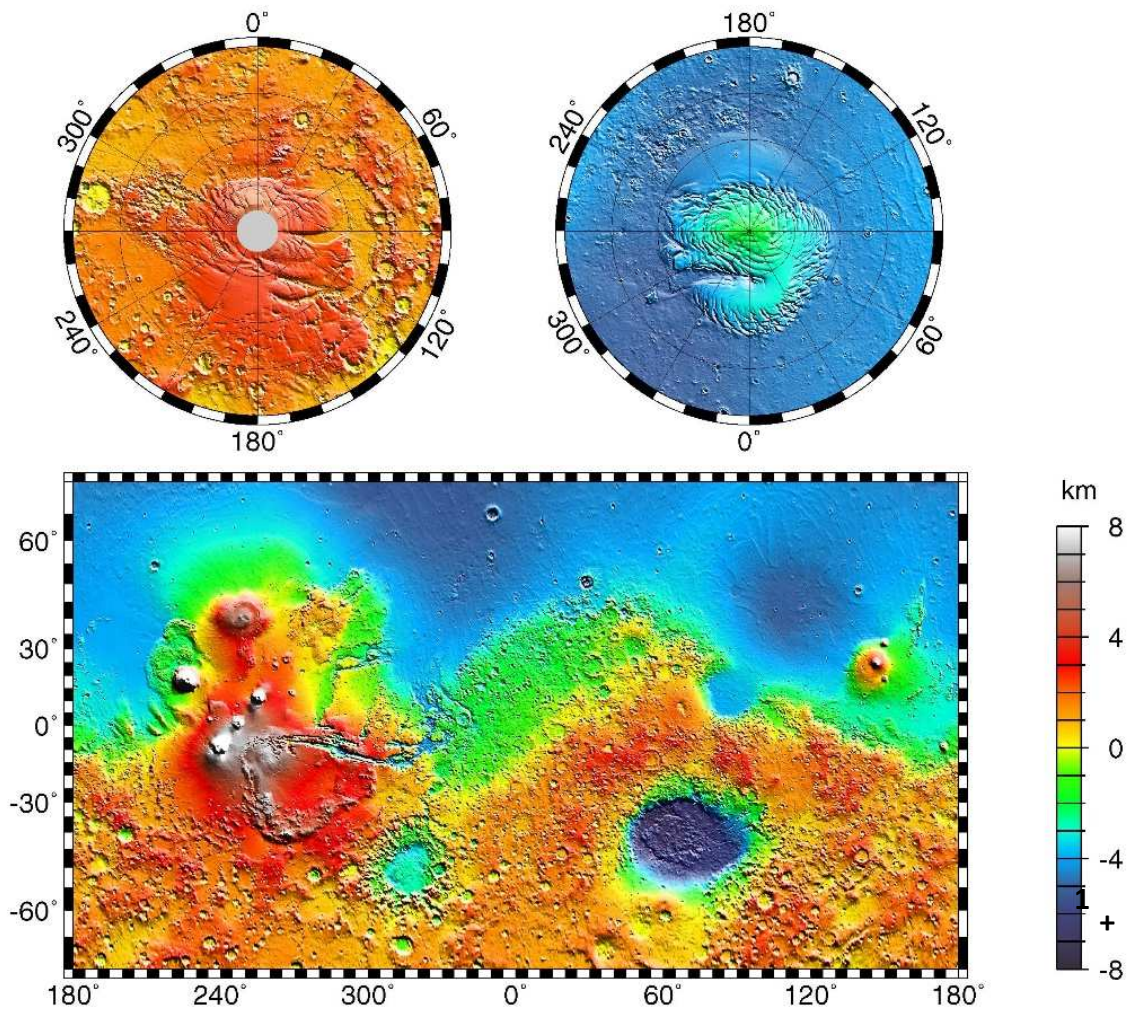


Figure I-12 : Carte de la topographie martienne, réalisée à partir des données obtenues par l'instrument MOLA (Mars Orbiter Laser Altimeter) sur l'orbiteur MGS (source : NASA / JPL).

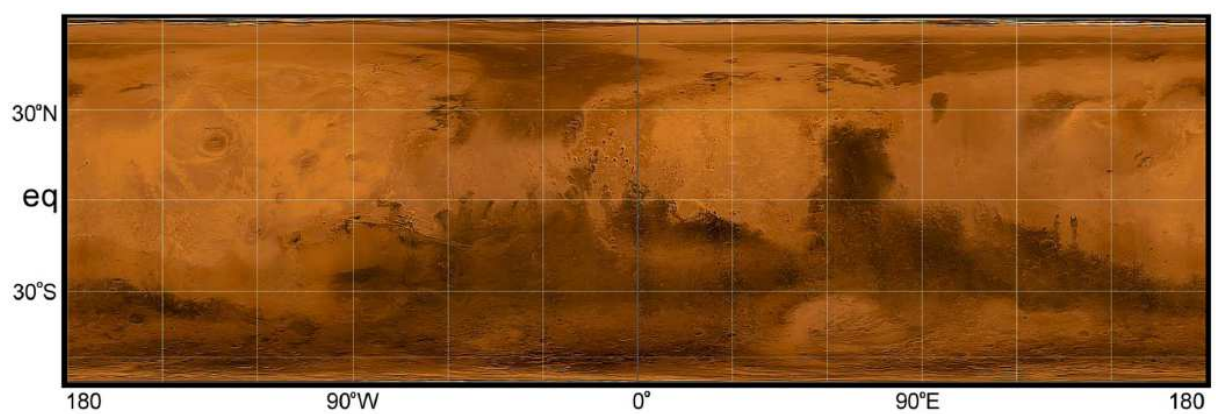


Figure I-13 : Carte de la surface martienne, réalisée à partir des observations obtenues par l'instrument MOC (Mars Orbiter Camera) de l'orbiteur MGS (Source : figure 24 dans Szwast *et al.*, 2006)

Basses plaines du nord et oxydes de fer

Au contraire des hauts plateaux du Sud, les basses plaines du Nord sont recouvertes en grande partie par des terrains plus clairs (albédo supérieur à 0,3 ; Figure I-13), peu cratérisés, qui donnent à Mars sa couleur rouge. Contrairement aux terrains les plus anciens, dans lesquels l'olivine et le pyroxène sont encore présents à une échelle globale, ces terrains plus jeunes et plus brillants ne présentent aucune signature des minéraux mafiques de la croûte initiale, alors qu'ils en sont issus (c'est le cas de la plus grande partie de la surface plus jeune, particulièrement au sein des basses plaines du Nord). En revanche, leur spectre montre la présence d'oxydes ferriques, qui donnent à Mars sa couleur rouille typique (Bibring *et al.*, 2006 ; Bibring and Langevin, 2006). Les constituants originaux ont été soit fortement altérés, soit recouverts par de la poussière fortement altérée (Bibring *et al.*, 2006).

Du fait de sa couleur rouge, et également car ils se forment au sein de systèmes d'altération sur Terre, les premiers minéraux proposés pour la surface de Mars étaient des minéraux contenant du fer. Les observations ont confirmé cela : le régolithe martien contient environ 20% en poids de Fe^{3+} , principalement sous la forme d'oxydes et d'(oxy)hydroxydes de fer (Chevrier and Mathé, 2007). Le groupe des oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes de fer possède pour anion soit un oxygène ($-\text{O}$), soit un groupement hydroxyle ($-\text{OH}$), soit un oxygène et un hydroxyle ($-\text{OOH}$), respectivement (Stanjek, 2003). Les différents orbiteurs qui ont réalisé des mesures spectroscopiques ont également fourni des preuves de la présence de divers (oxy)hydroxydes de fer à la surface de Mars. Les principales phases identifiées sont des formes variées d'hématite – depuis la forme microcristalline rouge jusqu'à la forme cristalline spéculaire grise – et goethite. L'hématite est un oxyde de fer de formule $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, et la goethite est un oxyhydroxyde de fer de formule $\alpha\text{-FeOOH}$. La présence de ces phases a été confirmée par des mesures *in situ* réalisés par les sondes Viking 1 et 2, Mars Pathfinder, et les rovers MER. L'échantillonnage des phases magnétiques du sol, suivi par l'analyse spectrométrique par Mini-TES et Mössbauer (expériences réalisées par les sondes Viking et par les rovers Pathfinder et MER) ont montré que le sol est uniformément enrichi en une ou plusieurs phases fortement magnétiques (1 – 7% du sol serait constitué de minéraux magnétiques) de nature inconnue (Chevrier and Mathé, 2007).

Dans Meridiani Planum, où de l'hématite cristalline avait déjà été détectée depuis l'orbite par MGS-TES, des sphérules d'hématite (des concrétions d'hématite cristalline) (Figure

I-14), associées à des sulfates ferriques (jarosite) ont été détectées par Opportunity au sein d’affleurements évaporitiques. Il est très probable que l’hématite identifiée par MGS-TES corresponde aux sphérules détectées par Opportunity, en raison de leur caractère gris et cristallin, par contraste avec les autres formes – très distinctes – d’hématite. Spirit a également trouvé des phases contenant du fer, indiquant la présence de nanophase plus ou moins amorphe, d’oxydes et d’oxyhydroxydes de fer (magnétite, hématite et goethite), et de sulfate de fer (III) (Chevrier and Mathé, 2007). La magnétite est un oxyde de fer de formule $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$.



Figure I-14 : Image de l’instrument Pancam du rover Opportunity, montrant des billes (ou sphérules, ou encore « berries » ou « blueberries ») d’hématite cristalline sur le site de Meridiani Planum (source : NASA / JPL / Cornell). La marque circulaire correspond à un brossage de la roche pour mesures par l’instrument MIMOS (Miniaturised Mössbauer Spectrometer).

L’anti-corrélation entre les minéraux mafiques (olivine et pyroxène) des vieux terrains et les minéraux altérés (sous la forme d’oxydes de fer) des jeunes terrains est mise en évidence par l’observation des cartes globales du pyroxène et des oxydes ferriques nanophase (Figure I-15) (Bibring *et al.*, 2006). Il est supposé que les terrains clairs ont été altérés non pas par l’eau, mais par voie chimique. En effet, il a été montré qu’ils ne sont pas hydratés, et qu’ils n’ont pas besoin de la présence d’eau liquide pour se former (Bibring *et al.*, 2006). L’altération qui les a formés ne résulte donc pas de l’action d’eau liquide, contrairement à ce qui était pensé auparavant. L’oxydation des plaines du Nord, à l’origine de la couleur rouille de Mars,

viendrait plutôt d'une lente oxydation de la surface par des constituants atmosphériques, présents en faible concentration, réalisée au cours des derniers 3,5 Ga (Bibring *et al.*, 2006). Il semble également que cette altération n'ait affecté le régolithe que de manière superficielle. Cette hypothèse est supportée par les observations d'une fine croûte d'altération sur des roches basaltiques par le rover Spirit sur son site d'atterrissage de Gusev (Bibring *et al.*, 2006). Cette croûte est épaisse de quelques millimètres au plus, et la roche sous-jacente n'est pas altérée. Le léger bêchage du sol par les roues des rovers Spirit et Opportunity a également laissé apparaître des minéraux sombres et non altérés, montrant la faible épaisseur de la couche d'altération.

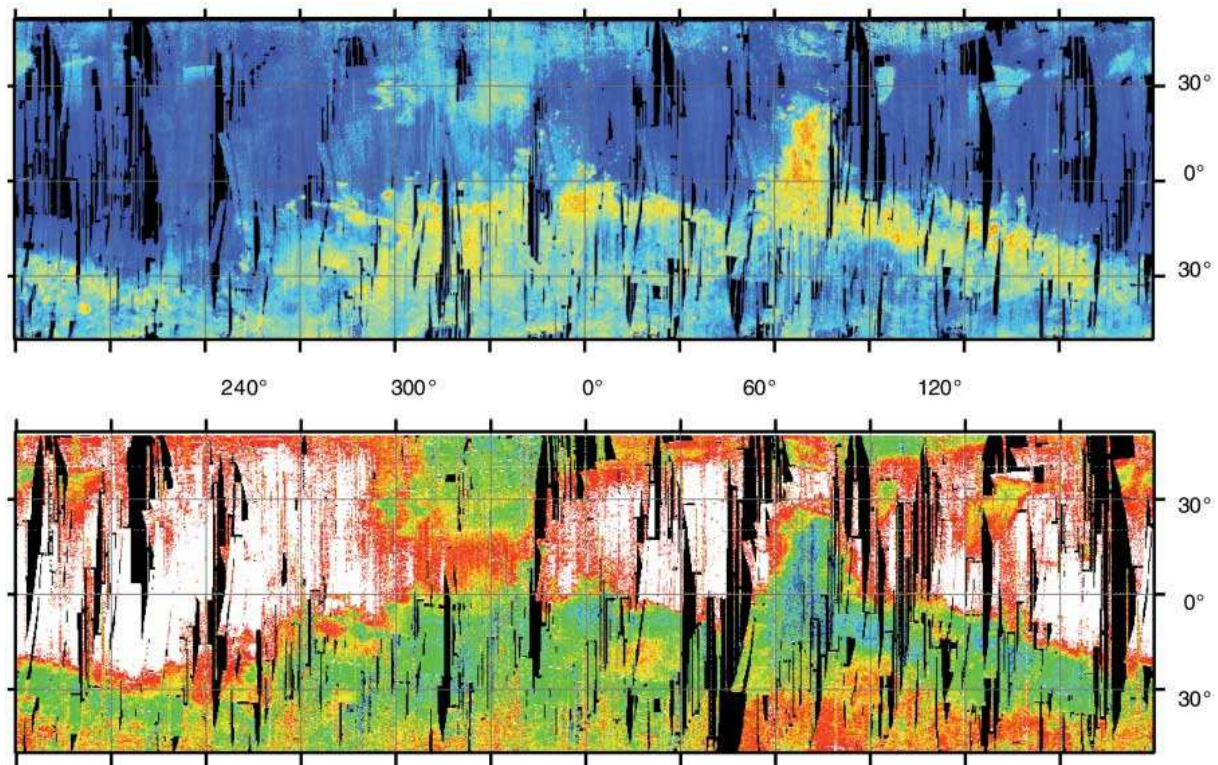


Figure I-15 : Cartes globales du pyroxène (en haut) et des oxydes ferriques nanophases anhydres (en bas), réalisées grâce aux données recueillies par l'instrument OMEGA de l'orbiteur Mars Express. La croûte ancienne et cratérisée, montrant de fortes concentrations en pyroxène (en haut, jaune à rouge) n'est pas couverte par les minéraux altérés (en bas, bleu à vert). Inversement, les terrains sans minéraux mafiques (en haut, bleu) correspondent aux plus fortes concentrations en oxydes de fer (en bas, rouge à blanc) (Source : (Bibring *et al.*, 2006))

b) L'eau et les minéraux produits par l'altération aqueuse

Bien que l'eau liquide ne semble pas être responsable de l'oxydation superficielle et tardive des plaines du Nord, il semble qu'elle ait tout de même joué un rôle dans l'histoire de la planète.

De nos jours, la pression atmosphérique moyenne sur Mars est de 7 mbar, la température moyenne est de 218 °K, et la glace d'eau se sublime dans l'atmosphère, sous-saturée en eau (Ehlmann *et al.*, 2011).

Des traces d'eau ont été détectées sur Mars, sous forme de vapeur d'eau et de nuages de glace d'eau dans l'atmosphère, ainsi que de la glace d'eau près de la surface aux hautes latitudes, et à la surface dans les régions polaires (Jakosky and Mellon, 2004).

Plus récemment, l'atterrisseur Phoenix a permis de mettre en évidence une fine couche de glace d'eau à une profondeur de 5 à 18 cm, ainsi qu'un recouvrement de la surface par de la neige et du givre pendant la nuit. De plus, suite au creusement d'une tranchée dans le sol par le bras robotique de Phoenix, plusieurs morceaux d'un matériau clair ont été mis en évidence, et avaient disparu quatre sols plus tard. Ce comportement est en adéquation avec de la glace d'eau disparaissant par sublimation (Smith *et al.*, 2009).

Dans le cadre de la mission MSL (rover Curiosity), lors du chauffage d'échantillons de dépôts éoliens (cratère Gale, site de Rocknest) et de l'analyse des gaz libérés, de l'eau a été détectée. L'abondance de cette eau (représentant 1,5 à 3% de la masse de sol) et sa température de libération suggèrent que l'eau est liée au sein d'un composant amorphe de l'échantillon (Leshin *et al.*, 2013). De plus, un perchlorate de calcium hydraté, de formule $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$, représente le candidat le plus pertinent pour expliquer la libération d'O₂ coïncidant avec une libération de chlore, libérations observées au cours de cette expérience (Glavin *et al.*, 2013).

De l'eau a également été détectée par analyse des gaz libérés lors de la pyrolyse de deux échantillons de roches sédimentaires (nommés John Klein et Cumberland) provenant de la baie de Yellowknife (cratère Gale) (Ming *et al.*, 2014). La formation sédimentaire Yellowknife Bay, dans le cratère Gale, est interprétée comme étant un dépôt lacustre peu profond (Grotzinger *et al.*, 2014; Vaniman *et al.*, 2014). Elle est constituée de trois membres stratigraphiques : Sheepbed, Gillespie Lake, et Glenelg. Le membre Sheepbed est le plus bas stratigraphiquement. Sa base n'est pas exposée, et il est composé de mudstone de couleur grise en couches (McLennan *et al.*, 2014). C'est au sein du membre stratigraphique Sheepbed qu'ont été prélevés les échantillons John Klein et Cumberland. Au sein de ces échantillons, les

phases incorporant de l'eau (sous forme H_2O ou OH) incluent des phyllosilicates, de la bassanite (un sulfate de calcium hydraté de formule $CaSO_4 \cdot 0.5H_2O$), de l'akaganéite (un oxyhydroxyde de fer contenant du chlore, de formule $\beta\text{-Fe}^{3+}O(OH,Cl)$), et des matériaux amorphes (Ming *et al.*, 2014). Le phyllosilicate (une smectite) de Cumberland présente un large espacement inter-feuillets, suggérant, entre autres explications, la présence d'eau entre ses feuillets (Vaniman *et al.*, 2014).

Toujours au cratère Gale, une analyse de l'humidité relative, et de la température de l'air et du sol par le rover Curiosity a permis de montrer que les conditions au sein du cratère sont favorables à la formation temporaire, pendant la nuit, d'eau liquide contenant des sels, dans les cinq centimètres supérieurs de la sous-surface. Cette eau serait évaporée après le lever du soleil (Martín-Torres *et al.*, 2015).

Les calottes glaciaires polaires sont également constituées de glace d'eau, recouverte par une fine couche de glace de dioxyde de carbone pour la calotte sud (Bibring *et al.*, 2005; Langevin *et al.*, 2005b).

Ainsi, de nos jours, l'eau sur Mars semble exister principalement sous forme solide et gazeuse, auxquelles nous pouvons ajouter les résultats récents, montrant une présence d'eau liée au sein de minéraux, et corroborant une présence temporaire d'eau liquide en faible quantité dans la sous-surface proche.

Cependant, il semble que l'eau liquide n'ait pas toujours été présente sur Mars de manière ponctuelle et en faibles quantités: les premières observations de Mars ont permis l'observation de réseaux de vallées (Figure I-16), de deltas, et de chenaux d'écoulement (Figure I-17), fournissant des preuves géomorphologiques de la présence d'eau de surface au cours du Noachien et de l'Hespérien (Ehlmann *et al.*, 2011). Certains auteurs proposent la présence d'un vaste océan recouvrant l'hémisphère Nord il y a environ 3,5 Ga (Di Achille and Hynek, 2010).



Figure I-16 : Image prise par l'orbiteur Viking 1 (le 13 septembre 1976), montrant Parana Valles, un réseau de vallées dans la région Margaritifer Sinus, sur Mars. La zone représentée est large d'environ 250 km (source : NASA / JPL).



Figure I-17 : Mosaïque montrant Kasei Valles, un chenal d'écoulement (source : ESA / DLR / FU Berlin (G. Neukum))

Le rôle joué par l'eau au cours de l'histoire de Mars est également mis en évidence par la détection, au sol et depuis l'orbite, de minéraux produits par une altération aqueuse. Ces minéraux d'altération incluent notamment des sulfates (Bandfield, 2002; Gendrin et al., 2005; Squyres et al., 2004; Vaniman et al., 2014), ainsi que des minéraux hydratés, tels que des phyllosilicates (Poulet et al., 2005; Vaniman et al., 2014). Plus récemment, des carbonates (Ehlmann *et al.*, 2008) et des chlorures (Osterloo *et al.*, 2008) ont été détectés.

Par la suite, nous considérerons comme minéral hydraté tout minéral contenant dans sa structure de l'eau H_2O ou un groupement hydroxyle OH ; définition utilisée par exemple par Bishop (2005) ou Rivkin *et al.* (2002). Ainsi, cela inclut par exemple les hydroxydes/oxyhydroxydes de fer, phyllosilicates, carbonates hydratés et sulfates hydratés (un tableau plus exhaustif peut être trouvé dans Bishop, 2005. L'auteur considère également comme hydratés les minéraux qui peuvent adsorber de l'eau à leur surface de leurs grains, sous l'effet des charges de surface).

Phyllosilicates et autres silicates hydratés

Que sont les phyllosilicates ?

Les phyllosilicates (du grec ancien *phyllon*, « feuille ») sont des silicates dans lesquels les tétraèdres (élément de base des silicates) sont reliés par trois de leurs sommets (oxygènes) et forment un réseau plan à maille hexagonale, ou couche tétraédrique (Figure I-18). La formule globale des phyllosilicates est donc $(Si_2O_5)^{4-}$ ou $(Si_4O_{10})^{4-}$.

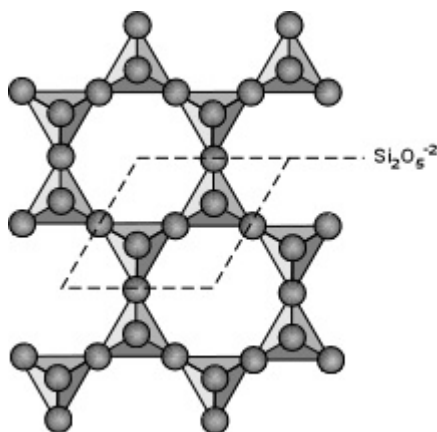


Figure I-18: structure des phyllosilicates (source : Université de Tulane)

La plupart des phyllosilicates comportent des anions OH^- , qui s'incorporent dans le réseau cristallin (figure I-19), leur conférant la qualité de minéraux hydratés (Bishop, 2005; définition de minéral hydraté). Cependant, seuls certains phyllosilicates sont capables d'incorporer des molécules d'eau entre leurs couches.

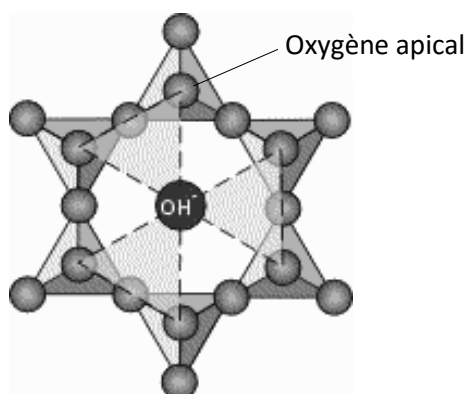


Figure I-19 : position de l'anion OH^- dans le réseau cristallin des phyllosilicates (Université de Tulane)

En plus des couches tétraédriques (abrégées par la lettre T), les phyllosilicates sont également constitués de couches octaédriques (abrégées par la lettre O). Ces couches octaédriques sont en fait constituées de cations (divalents ou trivalents) se trouvant en coordination octaédrique avec les oxygènes ou ions OH^- des couches tétraédriques (figure I-20). L'oxygène du tétraèdre utilisé pour la coordination est celui des quatre qui n'est pas utilisé pour former la couche tétraédrique (on l'appelle l'oxygène apical, cf. figure I-19).

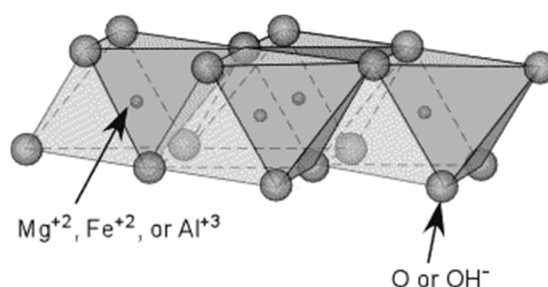


Figure I-20 : structure d'une couche octaédrique (Université de Tulane). Les oxygènes représentés ici sont les oxygènes apicaux des tétraèdres.

Ces différentes couches (T et O) sont empilées au sein d'un feuillet, et les phyllosilicates sont constitués d'un empilement de feuillets. La façon dont les couches tétraédriques et

octaédriques sont empilées au sein d'un feuillet permet de distinguer les différents phyllosilicates :

- les phyllosilicates TO (également appelés 1:1), où chaque feuillet est constitué d'une couche tétraédrique et d'une couche octaédrique (figure I-21). Les feuillets sont liés entre eux par des liaisons Van der Waals.

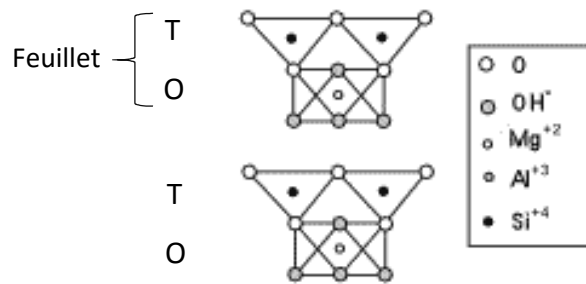


Figure I-21 : structure des phyllosilicates TO (Université de Tulane)

- les phyllosilicates TOT (ou 2:1), où chaque feuillet est constitué d'une couche octaédrique située entre deux couches tétraédriques (figure I-22). Les feuillets sont également liés entre eux par des liaisons Van der Waals.

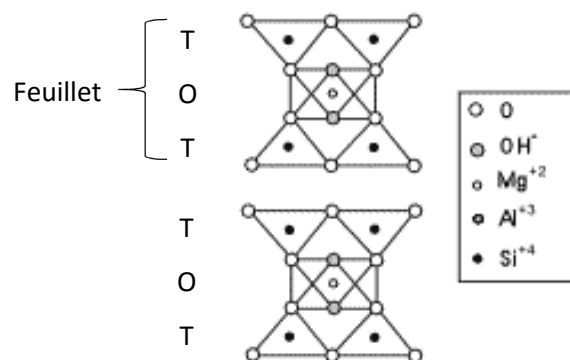


Figure I-22 : structure des phyllosilicates TOT (Université de Tulane)

- les phyllosilicates TOT:O (ou 2:1:1, ou 2:2), pour lesquels une couche octaédrique est immiscée entre chaque feuillet TOT (figure I-23).

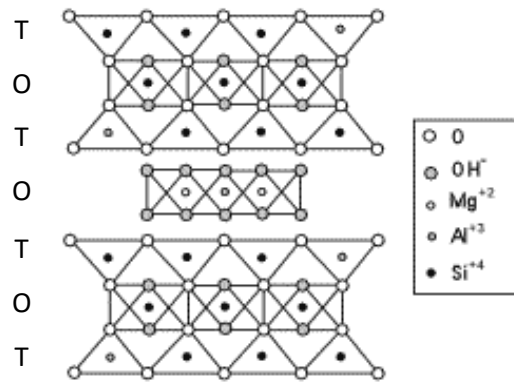


Figure I-23 : structure des phyllosilicates TOT:O

Selon si les cations de la couche octaédrique sont divalents ou trivalents, le phyllosilicate sera qualifié de dioctaédrique et trioctaédrique, respectivement.

A titre d'exemple, la lizardite $\text{Mg}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ est un phyllosilicate trioctaédrique ; et la kaolinite $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ est un phyllosilicate dioctaédrique (ces deux phyllosilicates sont de structure TO).

Les phyllosilicates incluent (cette classification peut varier selon les sources) les micas, le groupe des chlorites, le groupe de la serpentine, le talc, et les argiles (figure I-24). Sur terre, les argiles sont les produits les plus communs de la météorisation (« weathering ») chimique et un des plus abondants constituants des roches sédimentaires.

Les argiles comprennent les kandites, les smectites et les illites (figure I-24). Les chlorites sont parfois considérées comme faisant partie des argiles.

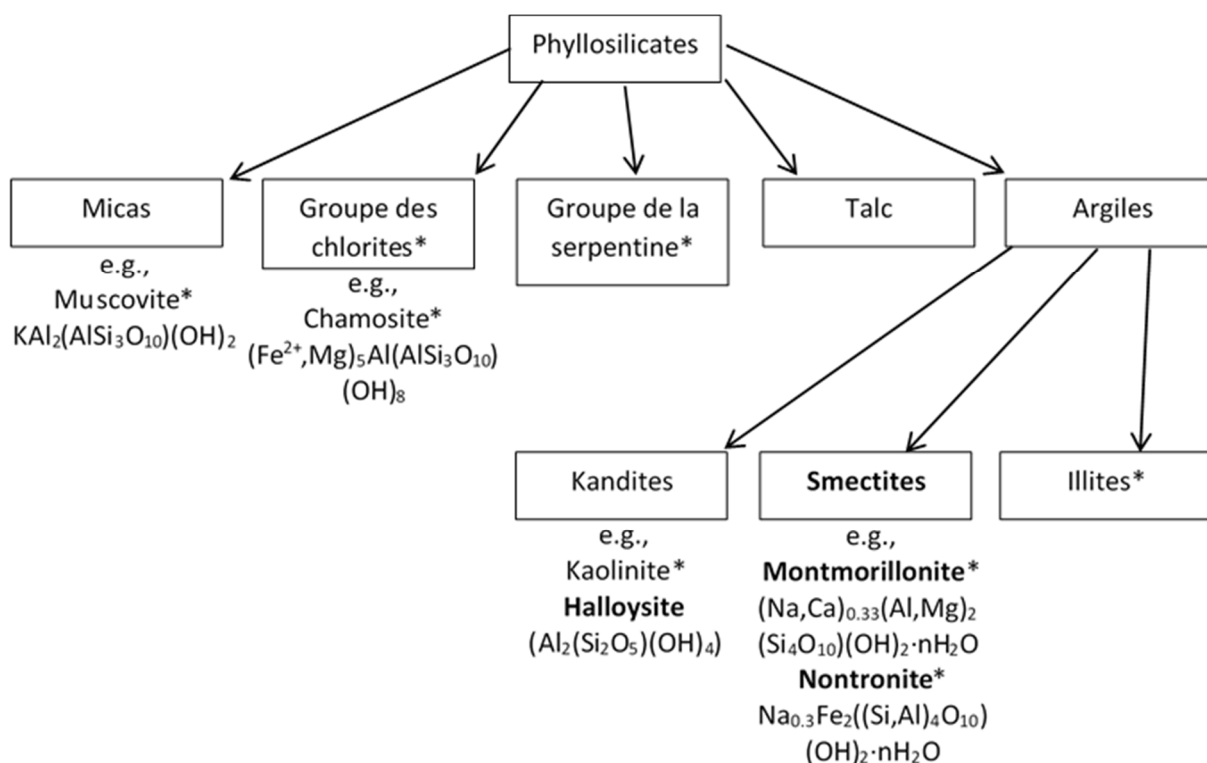


Figure I-24 : classification des phyllosilicates, avec quelques exemples. Les minéraux dont le nom est en gras sont des minéraux capables d'incorporer de l'eau entre leurs feuillets. Les minéraux marqués d'un astérisque ont été détectés sur Mars. Source de la classification : Université de Tulane, 2011. Remarque : la nomenclature évolue constamment, cette classification est donc susceptible d'être différente de celle rencontrée dans d'autres sources. La nomenclature et la classification des minéraux sont revues par la « Commission on New Minerals, Nomenclature and Classification » (CNMNC) de l'« International Mineralogical Association » (IMA). Les formules données dans ce manuscrit sont issues de mindat.org, une base de données en ligne tenue par la « Hudson Institute of Mineralogy » et basée sur la nomenclature de la CNMNC.

Comme précisé plus avant, seuls certains phyllosilicates sont capables d'incorporer des molécules d'eau entre leurs feuillets. C'est par exemple le cas de la vermiculite et des smectites, pouvant incorporer des molécules d'eau entre leurs feuillets TOT. Ces deux types de phyllosilicates sont donc capables d'expansion, et leur volume augmente lorsque de l'eau est intégrée à leur structure. La vermiculite est généralement classée dans le groupe des argiles, voire dans un groupe appelé groupe montmorillonite-vermiculite (la montmorillonite étant elle-même une smectite, donc une argile).

Cependant, toutes les argiles ne sont pas capables d'incorporer des molécules d'eau entre leurs feuillets. Par exemple, la kaolinite (de formule $Al_2(Si_2O_5)(OH)_4$), l'argile la plus

commune parmi les kandites, ne possède pas d'eau entre ses feuillets TO, au contraire de l'halloysite, (également une kandite), de composition similaire mais capable d'incorporer de l'eau entre ses feuillets. Lorsqu'elle est hydratée, la formule de l'halloysite peut être écrite de la manière suivante : $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (à noter que la kaolinite et l'halloysite sont parfois classées dans un groupe appelé le groupe kaolinite-serpentine). Les illites ne peuvent pas non plus incorporer d'eau entre leurs feuillets TOT, car l'espace inter-feuillet est comblé par des cations K^+ , Ca^{2+} ou Mg^{2+} (à noter que les illites sont parfois classées dans le groupe des micas).

Histoire de la détection des phyllosilicates.

Des phyllosilicates ont été détectées de manière non ambiguë pour la première fois sur Mars par le spectromètre infrarouge OMEGA de l'orbiteur Mars Express. Ces phyllosilicates ont été détectés dans les hauts plateaux du sud, au sein de terrains datant du Noachien, en association avec deux types de terrains : des dépôts sombres et des affleurements érodés (Poulet *et al.*, 2005; Ehlmann *et al.*, 2013). Les phyllosilicates correspondant le plus aux signatures spectrales observées incluent la nontronite (de formule $\text{Na}_{0.3}\text{Fe}_2((\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), la montmorillonite (de formule $(\text{Na},\text{Ca})_{0.33}(\text{Al},\text{Mg})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (argiles riches en Fer et en Al, respectivement), et la chamosite (chlorite de Fe/Mg, de formule $(\text{Fe}^{2+},\text{Mg})_5\text{Al}(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_8$) (Poulet *et al.*, 2005). La nontronite et la montmorillonite font partie du groupe des smectites, argiles possédant la capacité d'absorber de l'eau entre leurs feuillets.

Par la suite, le rover Curiosity a permis d'apporter de nouvelles détections de phyllosilicates, lors de son passage à Yellowknife Bay. L'analyse de données obtenues par Diffraction à Rayons X (DRX), acquises par l'instrument CheMin (Chemistry and Mineralogy) du rover Curiosity, a permis de mettre en évidence la présence de smectites trioctahédriques 2:1 au sein de deux échantillons (John Klein et Cumberland) prélevés au sein du membre Sheepbed (Vaniman *et al.*, 2014), un des trois membres stratigraphiques de la formation sédimentaire Yellowknife Bay. La smectite de Cumberland présente un large espacement inter-feuillets, suggérant, entre autres explications, la présence d'eau entre ses feuillets (Vaniman *et al.*, 2014). De plus, les smectites présentes dans les échantillons John Klein et Cumberland pourraient être à l'origine d'une partie de l'eau détectée lors de l'analyse

des gaz libérés (« Evolved Gas Analysis », EGA) réalisée par SAM sur ces échantillons (Ming *et al.*, 2014).

De son côté, le rover Opportunity s'est rendu au cratère Endeavour, sur le site Matijevic Hill, où des smectites riches en Fe^{3+} avaient été détectées par le spectromètre CRISM (Compact Reconnaissance Imaging Spectrometer for Mars) sur l'orbiteur MRO (Mars Reconnaissance Orbiter). Des données obtenues suite à l'analyse élémentaire de roches par l'instrument APXS (Alpha Particle X-Ray Spectrometer) sur Opportunity sont en accord avec la présence de telles smectites. De plus, des données obtenues par Pancam (Panoramic Camera), sous la forme d'une bande d'absorption pouvant être expliquée par la présence d'une smectite riche en Fe^{3+} , fournissent un indice de plus en faveur de la présence de telles smectites à Matijevic Hill. L'origine de la signature détectée par CRISM provient probablement de faibles couches de sédiments (« veneers ») sombres, recouvrant discontinuellement des affleurements plus clairs, et constituées de smectites riches en Fe^{3+} (Arvidson *et al.*, 2014).

Localisation des phyllosilicates

Sur Mars, les phyllosilicates détectés depuis l'orbite le sont dans les terrains les plus anciens, c'est-à-dire ceux du Noachien : soit dans les hauts plateaux du Sud, soit dans des sols exposés des basses plaines du nord (érosion, cratères). La majorité des argiles détectées sur Mars sont en relation avec des cratères d'impacts : dans les pics centraux, les murs ou les éjectas. Elles sont également détectées dans des sols exposés par une forte érosion et dans des escarpements tectoniques de grande taille : certains exposent des argiles qui étaient enfouies à des centaines, voire jusqu'à des milliers de mètres. Des argiles sont également présentes dans certains dépôts sédimentaires (Bibring and Langevin, 2006; Ehlmann *et al.*, 2013).

Une cartographie globale à l'aide d'OMEGA et du spectromètre CRISM sur l'orbiteur MRO a permis de découvrir de vastes affleurements (supérieurs à 100 000 km²) incluant des argiles, au sein de terrains autour de Nili Fossae et Mawrth Vallis. De plus, des milliers d'occurrences isolées d'argiles ont été détectées dans des affleurements de plus petite taille au sein des hauts plateaux du sud, ainsi qu'en association avec des grands cratères des basses plaines du nord (Ehlmann *et al.*, 2013). L'observation de cratères dans les basses plaines du nord, par OMEGA et CRISM (sur Mars Express et MRO, respectivement) a permis de mettre

en évidence la présence de phyllosilicates de Fe/Mg, de phyllosilicates d'Al (montmorillonite et kaolinite, de formule $\text{Al}_2(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$), ainsi que de chlorite (groupe de phyllosilicates) et de prehnite (un inosilicate de formule $\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$). Différents phyllosilicates sont parfois trouvés en association, par exemple au cratère Stokes (assemblage de phyllosilicates de Fe/Mg et de Al) (Carter *et al.*, 2010). Certaines régions montrent d'ailleurs une stratigraphie d'argiles Al au-dessus d'argiles Fe/Mg. Les assemblages d'argiles au sein de profondes unités stratigraphiques dans la croûte martienne incluent des smectites de Fe/Mg, des chlorites et des silicates hydratés formés à plus haute température (jusqu'à 400°C, *cf.* Ehlmann *et al.*, 2011). Ceux trouvés au sein des sédiments incluent des smectites de Fe/Mg, de la kaolinite, des sulfates, des carbonates et des sels de chlorure (Ehlmann *et al.*, 2013).

Les observations depuis l'orbite ont permis de montrer que les smectites de Fe/Mg sont les argiles les plus communes sur Mars, trouvées dans plus de 75% des emplacements où des silicates hydratés ont été détectés. La chlorite est le deuxième phyllosilicate le plus abondant. Des minéraux plus rares incluent la prehnite, la serpentine (un groupe de phyllosilicates), l'illite (un groupe de formule générale $\text{K}_{0.65}\text{Al}_{2.0}[\text{Al}_{0.65}\text{Si}_{3.35}\text{O}_{10}](\text{OH})_2$, classé dans les argiles, ou parfois les micas) ou la muscovite (un mica de formule $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$), la silice hydratée (de formule $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) et l'analcime (une zéolite, aluminosilicate de formule $\text{Na}_2(\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dont des assemblages de minéraux indiquant une altération à température élevée (Ehlmann *et al.*, 2013), jusqu'à 400°C (Ehlmann *et al.*, 2011). Ces derniers, ainsi que la chlorite, sont presque exclusivement associés à des cratères. Bien que moins communes que les argiles de Fe / Mg, des argiles de Al ont également été détectées sur Mars. Les sels, tels que les carbonates, chlorures et sulfates ne sont habituellement pas trouvés dans les mêmes unités géologiques que les argiles, une exception étant des argiles et des carbonates trouvés au sein du pic central du cratère Leighton, dans Syrtis Major. De plus, des chlorures, sulfates et carbonates ont pu être trouvés en association avec des argiles au sein de dépôts sédimentaires (Ehlmann *et al.*, 2013).

Alors que les argiles sont globalement distribuées dans les terrains du Noachien, les plaines volcaniques majeures de l'Hespérien au sein de Syrtis Major, ainsi que les plaines du nord, ne montrent aucune preuve non ambiguë de la présence d'argiles. A la place, des sulfates sont détectés au sein de quelques formations autour de Valles Marineris – formations datant de l'Hespérien et de l'Amazonien. Des sédiments dans les basses plaines du sud et dans les plaines de lave de l'Hespérien et de l'Amazonien montrent des preuves de la formation de

revêtements et croûtes de produits amorphes résultant d'une météorisation (Ehlmann *et al.*, 2013).

Pourquoi, sur Mars, la plupart des argiles détectées sont-elles en relation avec des cratères d'impact ? Les cratères servent de bassins dans lesquels les sédiments s'accumulent. De plus, ils servent de sondes de la subsurface, grâce à l'excavation de matériaux enterrés en profondeur et leur exposition au sein des éjectas, murs et pics centraux. Des études au laboratoire ont permis de montrer que lors de la formation des cratères, le choc ne forme pas d'argiles, mais des matériaux choqués pourraient être plus susceptibles à une météorisation ultérieure en argiles. Finalement, la chaleur de l'impact pourrait entraîner la formation de systèmes hydrothermaux en profondeur. Ainsi, les argiles associées aux cratères d'impacts, c'est-à-dire la majorité des argiles trouvées sur Mars, pourraient avoir été formées par (i) l'excavation d'argiles formées dans le passé ou (ii) une circulation hydrothermale causée par l'impact. En général, les observations correspondent à une présence d'argiles causée par le premier mécanisme (Ehlmann *et al.*, 2013). L'observation d'argiles au sein des cratères serait donc due à l'excavation des couches datant du Noachien, plutôt qu'à une formation d'argiles suite à la formation de systèmes hydrothermaux causée par l'impact (Ehlmann *et al.*, 2011).

Implications

Diverses implications peuvent être formulées quant à la découverte d'argiles sur Mars, mais aussi quant à la restriction des argiles aux terrains du Noachien. De plus, l'analyse de la façon dont les argiles se sont formées permet également d'apporter des réponses relatives à l'environnement martien primitif.

Premièrement, les phyllosilicates constituent un indice fort en faveur de l'existence de l'eau liquide pendant de longues périodes au cours de l'histoire de Mars. En effet, pour se former, ces minéraux nécessitent d'abondantes quantités d'eau en contact prolongé avec des silicates primaires (Bibring and Langevin, 2006). Des phyllosilicates ont notamment été détectés *in situ* par l'instrument CheMin de Curiosity à Yellowknife Bay (Vaniman *et al.*, 2014), site interprété comme étant un dépôt lacustre peu profond (Grotzinger *et al.*, 2014; Vaniman *et al.*, 2014).

Deuxièmement, la présence d'argiles dans les terrains les plus anciens (hauts plateaux du sud, excavations de cratères des basses plaines du nord), ceux du Noachien, indique une

interaction de longue durée entre l'eau et la roche au commencement de l'histoire de Mars, il y a plus de 3,7 Ga. La restriction des phyllosilicates aux terrains les plus anciens pourrait indiquer des conditions climatiques spécifiques au cours du Noachien, avec une présence d'eau plus abondante que celle nécessaire à la formation de sulfates au cours de l'Hespérien (Poulet *et al.*, 2005, dans Chevrier and Mathé, 2007 ; Bibring and Langevin, 2006).

Finalement, l'analyse de la façon dont les argiles se sont formées peut indiquer quelles conditions environnementales prédominaient au cours de l'histoire primitive de Mars (Ehlmann *et al.*, 2011). Les argiles peuvent se former à proximité de la surface, par météorisation ; ou dans de l'eau souterraine dominée par la glace (toujours à proximité de la surface). Mais elles peuvent aussi se former sous la surface, sous l'action de fluides hydrothermaux (un fluide hydrothermal est un fluide chaud et riche en eau, circulant dans la croûte de la planète; *cf.* Arndt, 2011) (Ehlmann *et al.*, 2013). Si les phyllosilicates se sont formés sous la surface, en présence d'eau souterraine / fluides hydrothermaux, il est possible que l'environnement martien ait toujours été aride et froid, excepté pour quelques épisodes ponctuels. Cependant, si les argiles se sont formées près de la surface par météorisation, comme il est couramment observé sur Terre, leur présence pourrait indiquer, dans le passé, des conditions de surface plus chaudes et plus humides qu'à présent, ainsi qu'une atmosphère primitive dense (Bibring *et al.*, 2006; Ehlmann *et al.*, 2011).

Sulfates

De fortes concentrations de soufre ont fréquemment été détectées dans le sol martien par Viking, Pathfinder et les MER (Chevrier and Mathé, 2007). Ainsi, selon les auteurs, ces fortes abondances de soufre sont trouvées sur la plus grande partie de la surface martienne connue ; et sont expliquées par la présence de sulfates, résultant de l'altération du socle basaltique. Les sulfates sont des minéraux dont l'élément de base est le groupement SO_4^{2-} .

Depuis l'orbite, Mars Express et MRO ont permis l'identification de différents sulfates, incluant du gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Bibring *et al.*, 2005; Gendrin *et al.*, 2005; Langevin *et al.*, 2005a), de la kiesérite ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Arvidson *et al.*, 2005; Bibring *et al.*, 2005; Gendrin *et al.*, 2005), de l'alunite ($\text{KAl}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) (Swayze *et al.*, 2008; dans Ehlmann *et al.*, 2013), de l'hydroniumjarosite (jarosite contenant l'ion hydronium H_3O^+ , de formule $(\text{H}_3\text{O})\text{Fe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) (Milliken *et al.*, 2008), et un sulfate de fer(III) hydroxylé (Bishop *et al.*,

2009). L'instrument CRISM (à bord de MRO) a permis la détection de sulfates mono- et polyhydratés. Les sulfates monohydratés détectés sont probablement de la szomolkonite ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et de la kiesérite ; tandis que les sulfates polyhydratés sont possiblement de la ferricopiapite ($\text{Fe}_5(\text{SO}_4)_6\text{O}(\text{OH}) \cdot 20\text{H}_2\text{O}$), de la mélanterite ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ou de la starkyite ($\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Bishop *et al.*, 2009). L'instrument OMEGA (à bord de Mars Express) a permis la détection de sulfates polyhydratés, incluant possiblement de l'epsomite ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Gendrin *et al.*, 2005).

De plus, des sulfates ont été identifiés *in situ* dans des affleurements sédimentaires de Meridiani Planum (corroborant la détection de sulfates au sein de Terra Meridiani par OMEGA) par les spectromètres Mössbauer et mini-TES d'Opportunity, qui a détecté des concentrations atteignant les 25% en masse de SO_3 (Squyres *et al.*, 2004). Les principaux sulfates identifiés sont la jarosite (le groupe des jarosites a pour formule générale $(\text{K}, \text{Na}, \text{H})\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (Christensen *et al.*, 2004; Klingelhöfer *et al.*, 2004), des sulfates de magnésium (Christensen *et al.*, 2004; Squyres *et al.*, 2004) et des sulfates de calcium (Christensen *et al.*, 2004; Squyres *et al.*, 2004). Des sulfates de magnésium, fer(III) et calcium ont également été identifiés par Spirit dans les affleurements de Columbia Hills (Ming *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), avec des concentrations en sulfates allant jusqu'à 44% (Ming *et al.*, 2006).

Les sulfates hydratés détectés depuis l'orbite grâce à OMEGA sont en association avec des dépôts stratifiés de couleur claire, au sein de Valles Marineris, Terra Meridiani et Margaritifer Sinus (Gendrin *et al.*, 2005). Toujours au sein de Terra Meridiani, de l'eau moléculaire a été détectée : adsorbée à la surface de matériaux stratifiés, et incorporée sous forme d'eau de structure dans de la kiesérite, au sein d'un plateau de couleur sombre (Arvidson *et al.*, 2005). Les auteurs concluent qu'Opportunity a analysé la partie supérieure des dépôts dans lesquels OMEGA a détecté l'eau moléculaire et la kiesérite. Cela indiquerait que des processus aqueux ont été impliqués dans la formation et/ou l'altération de matériaux sur des distances de centaines de kilomètres et à travers plusieurs centaines de mètres d'épaisseur (Arvidson *et al.*, 2005). Des sulfates sont également présents au sein de la région polaire Nord, dans une région correspondant à des dunes longitudinales sombres (Langevin *et al.*, 2005a).

L'activité volcanique aurait été la source la plus probable de soufre (sous la forme de H_2S , dioxyde de soufre SO_2 , ou de cendres pyroclastiques riches en soufre), nécessaire à la formation de sulfates (Langevin *et al.*, 2005a).

Différents processus peuvent être considérés pour expliquer la formation de sulfates, notamment la circulation d'eau souterraine dans des sédiments enterrés. En effet, ils auraient pu se former en profondeur, en présence de fluides riches en soufre, dans un environnement hydrothermal. Les dépôts stratifiés pourraient provenir de cendres volcaniques ou de dépôts éoliens, altérés par la suite en sulfates par une circulation d'eau souterraine acide. Les conditions hydrothermales pourraient aussi avoir favorisé le dépôt de sulfates par percolation d'eau salée souterraine (Gendrin *et al.*, 2005; Langevin *et al.*, 2005a).

Les sulfates pourraient également provenir de l'altération de minéraux mafiques (basaltes) sous l'action de pluie et/ou givre acide. En effet, l'eau pourrait avoir été rendue acide en surface par le dégazage volcanique, avec le sulfure d'hydrogène H_2S réagissant avec l'oxygène atmosphérique pour former l'acide sulfurique H_2SO_4 . L'olivine aurait été altérée en sulfates riches en magnésium ou en fer, tandis que le HCP et les feldspaths auraient été altérés en sulfates riches en calcium (Bibring *et al.*, 2005; Gendrin *et al.*, 2005; Langevin *et al.*, 2005a). Les basaltes de sous-surface auraient également pu être altérés par de l'eau souterraine acide ou des brouillards acides. Le SO_2 dégazé par les volcans peut être converti en H_2SO_4 en présence d'eau, formant un brouillard acide qui peut altérer les roches basaltiques de subsurface, entraînant la cristallisation de sulfates (Chevrier and Mathé, 2007).

Les sulfates pourraient également être le produit de l'altération de roches riches en sulfures. La présence de sulfures pourrait résulter d'un—enrichissement important de la lithosphère en soufre, phénomène lié à la différenciation et l'accrétion de Mars et au dégazage de SO_2 par les volcans. L'altération des sulfures entraîne l'acidification de l'eau sous l'action de l'acide sulfurique, ce qui favorise la dissolution des silicates (Chevrier and Mathé, 2007).

Finalement, les sulfates pourraient provenir de l'évaporation d'étendues d'eau stagnante en surface (Bibring *et al.*, 2005; Gendrin *et al.*, 2005; Langevin *et al.*, 2005a).

Récemment, des sulfures ont été proposés pour expliquer la détection d'espèces soufrées lors de la pyrolyse de roches sédimentaires (échantillons John Klein et Cumberland, prélevés au sein du membre stratigraphique Sheepbed) de la baie de Yellowknife (cratère Gale) par Curiosity (Ming *et al.*, 2014) (la formation sédimentaire Yellowknife Bay étant

constituée de trois membres stratigraphiques : Sheepbed, Gillespie Lake, et Glenelg). De plus, des données obtenues par DRX par l'instrument CheMin de SAM montrent que la mudstone Sheepbed contient des sulfates de calcium. En effet, de la bassanite et de l'anhydrite CaSO_4 ont été détectées au sein des échantillons John Klein et Cumberland. De l'anhydrite a également été détectée dans le dépôt éolien Rocknest (faisant partie du membre stratigraphique Glenelg) (Vaniman *et al.*, 2014).

Les membres stratigraphiques Sheepbed et Gillespie sont tous deux traversés par un réseau de fractures. Ces fractures se sont formées après la lithification des roches, et sont emplies d'un ciment ayant été identifié comme étant du sulfate de calcium. Certaines des fractures du membre Glenelg sont également emplies de sulfate de calcium (McLennan *et al.*, 2014). Les sulfates des fractures du membre Sheepbed montrent différents degrés d'hydratation (Grotzinger *et al.*, 2014). De plus, la bassanite détectée par CheMin au sein des échantillons John Klein et Cumberland (prélevés au sein du membre Sheepbed) est une des potentielles sources de l'eau libérée et détectée lors de l'EGA réalisée par SAM (Ming *et al.*, 2014). Les fractures (ainsi que des remplissages à l'intérieur de nodules creux) sont probablement la source principale ou unique des sulfates de calcium détectés au sein des échantillons John Klein et Cumberland (Vaniman *et al.*, 2014).

Finalement, au cratère Endeavour, Opportunity a mis en évidence des veines de sulfate de calcium traversant les roches de la bordure du cratère. Ces veines ont précipité à partir de fluides ayant circulé après l'impact ayant formé le cratère (Arvidson *et al.*, 2014).

Du fait de l'âge plus récent des terrains (du Noachien supérieur jusqu'à l'Hespérien, cf. Ehlmann *et al.* (2011) dans lesquels ils ont été observés – en comparaison avec ceux dans lesquels ont été observés des phyllosilicates – il semble que la formation des sulfates soit postérieure à celle des phyllosilicates. Les sulfates, qui sont des sels, nécessitent également la présence d'eau liquide pour se former, par précipitation. Cependant, ils peuvent se former plus rapidement que les phyllosilicates, sans nécessiter de l'eau stable pendant de longues périodes (Bibring and Langevin, 2006).

Carbonates

De nombreuses études ont prédit une atmosphère primitive martienne épaisse et enrichie en CO_2 et H_2O , due à l'intense activité volcanique de la jeune planète, qui aurait relâché d'importantes quantités de gaz. Cette couverture nuageuse dense aurait induit un effet de serre intense, ce qui aurait permis à l'eau liquide d'exister à la surface pendant de longues périodes (Chevrier and Mathé, 2007). Sur Terre, l'interaction entre l'hydrosphère/atmosphère enrichie en CO_2 , et les sols basaltiques riches en fer, a entraîné la formation du carbonate sidérite FeCO_3 (les carbonates sont des minéraux dont l'élément de base est le groupement CO_3^{2-}). On pourrait donc s'attendre à retrouver sur Mars de fortes quantités de carbonates à la surface, sous forme de réservoirs du CO_2 atmosphérique (Ehlmann *et al.*, 2008), d'autant plus en prenant en considération la découverte de carbonates de Ca/Mg/Fe dans la météorite martienne ALH84001 (Mittlefehldt *et al.*, 1994). Cependant, les premières détections de carbonates sur Mars ne l'ont été qu'à l'état de traces : MGS-TES a détecté des concentrations en carbonates inférieures à 5% (Bandfield *et al.*, 2003; dans Chevrier and Mathé, 2007) (majoritairement de la magnésite, MgCO_3), largement distribuées au sein de la croûte martienne. Il semble également que Spirit ait détecté des traces de carbonates (<5%) dans le régolithe du cratère Gusev, bien que la signature spectrale puisse être attribuée à des sulfates de fer (Chevrier and Mathé, 2007).

L'absence d'affleurements de carbonates est surprenante, puisque qu'une altération aqueuse a bien eu lieu et a produit des sulfates et des phyllosilicates. Il a donc été proposé que soit (i) le CO_2 n'était pas le gaz à effet de serre sur la jeune Mars, (ii) l'eau liquide n'est pas restée assez longtemps au contact de l'atmosphère de CO_2 pour permettre la formation de carbonates, (iii) la formation d'affleurements de carbonates a été inhibée, ou les affleurements ont été détruits par des conditions acides ou par décomposition (Ehlmann *et al.*, 2008). Puis, en 2008, l'instrument CRISM sur MRO a mis en évidence la présence de carbonate de magnésium dans la région de Nili Fossae. Le carbonate a été détecté au sein d'une unité rocheuse à l'échelle régionale, au contact de roches contenant des phyllosilicates et de roches contenant de l'olivine. Il s'est probablement formé au cours du Noachien ou du début de l'Hespérien, à partir de l'altération de l'olivine, soit par des fluides hydrothermaux, soit par de l'eau située près de la surface. La présence de carbonate ainsi que d'argiles suggère que l'eau était neutre à alcaline à l'époque de sa formation et que la météorisation acide, proposée comme étant caractéristique de l'Hespérien, n'a pas détruit ces carbonates, et par conséquent, n'a pas dominé tous les environnements aqueux (Ehlmann *et al.*, 2008).

Puis, du carbonate de calcium (CaCO_3) a été détecté en 2009 grâce aux instruments TEGA (Thermal and Evolved-Gas Analyzer) et MECA (Microscopy, Electrochemical, and Conductivity Analyzer) de l'atterrisseur Phoenix, à une concentration d'environ 3 à 5% en masse. Il a été mis en évidence par calorimétrie à balayage (avec une transition endothermique débutant à environ 725°C accompagnée par un dégagement de CO_2) ainsi que par la capacité tampon du sol vis-à-vis de l'ajout d'acide. La quantité de calcium est cohérente avec une formation dans le passé par interaction entre du CO_2 atmosphérique et des pellicules d'eau liquide sur des surfaces de particules (Boynton *et al.*, 2009). Lors de l'analyse du sol martien par le laboratoire de chimie humide ou « Wet Chemistry Laboratory » (WCL) sur l'atterrisseur Phoenix, un pH modérément alcalin ($7,7 \pm 0,5$) a été mesuré. Suite à l'ajout d'acide 2-nitrobenzoïque, le pH de la solution n'a pas été affecté, indiquant que le sol possède une qualité de tampon, probablement grâce à la présence de carbonate de calcium (Hecht *et al.*, 2009).

Spirit a détecté des affleurements riches en carbonate de fer – magnésium (16 à 34 % en masse) dans les collines Columbia au sein du cratère Gusev. La composition de ce carbonate correspond à la composition moyenne des globules de carbonates dans la météorite martienne ALH84001. Le carbonate présent à Gusev a probablement précipité à partir de solutions contenant des carbonates, sous des conditions hydrothermales, à un pH proche de la neutralité, en association avec une activité volcanique durant le Noachien (Morris *et al.*, 2010).

Au site de Rocknest, le chauffage du sol martien jusqu'à 835°C sous un flux d'hélium et l'analyse des gaz libérés (expérience EGA, de SAM sur MSL) a permis de détecter, entre autres composés, du CO_2 . Une grande partie de ce CO_2 pourrait provenir de la décomposition de carbonates de fer / magnésium, possiblement de sidérite et / ou de magnésite nanophase. Une partie du CO_2 détecté pourrait également être le résultat de la réaction des carbonates avec le HCl libéré au cours de l'analyse (HCl provenant probablement de la dégradation d'un perchlorate). La libération simultanée de CO_2 et d' O_2 pointe vers une troisième source potentielle de CO_2 : la combustion de molécules organiques. De telles molécules organiques pourraient être d'origine martienne, avoir été apportées depuis l'espace par des poussières interplanétaires et des micrométéorites, ou provenir de l'instrument (par exemple le MTBSTFA) (Leshin *et al.*, 2013).

Ces trois mécanismes (décomposition thermique de carbonates / réaction des carbonates avec HCl / combustion de matière organique) sont également potentiellement à l'origine de la détection de CO₂ par SAM lors de l'EGA réalisée sur les échantillons John Klein et Cumberland. Le HCl libéré au cours de l'analyse pourrait provenir, selon les auteurs, de chlorates / perchlorates, voire d'akaganéite (oxyhydroxyde de fer contenant du chlore). De plus, une partie du CO₂ observé lors de l'analyse de John Klein pourrait être du CO₂ adsorbé à la surface de smectites, ou d'assemblages de minéraux de type palagonite. Les auteurs invoquent finalement une autre source potentielle pour le CO₂ : la décarboxylation d'acides carboxyliques, produits métastables de la dégradation de potentielles molécules organiques sur Mars (par exemple l'acide mellitique) (Ming *et al.*, 2014).

Chlorures

D'autres sels, des chlorures, ont également été détectés sur Mars. En effet, des dépôts de surface correspondant à des matériaux contenant des chlorures ont été détectés au sein de la croûte ancienne du Sud, dans des terrains datant du milieu à la fin du Noachien (avec quelques occurrences dans des terrains du début de l'Hespérien). La détection et l'abondance de ces dépôts distincts, largement répandus au sein des hauts plateaux du Sud, suggèrent que de l'eau de surface a été présente et largement disponible dans l'histoire martienne précoce. En effet, les chlorures précipitent pendant l'évaporation de l'eau de surface ou de l'eau souterraine, et pendant le dégazage volcanique (Osterloo *et al.*, 2008).

c) Nature oxydative du sol martien

Les résultats obtenus par les expériences des sondes Viking (*cf.* parag. 1.2.3) suggèrent la présence d'un fort oxydant sur Mars (Yen, 2000) de nature inconnue. Par ailleurs, le H₂O₂ (Zent and McKay, 1994) et les perchlorates (Navarro-González *et al.*, 2010) ont été proposés en tant que responsables, du fait de leur caractère oxydant, de la réactivité du sol martien lors des trois expériences biologiques (« Gas Exchange », « Carbon assimilation » et « Labeled release ») réalisées par les sondes Viking. Or, en plus des oxydes de fer (leur présence aurait pu empêcher la détection de matière organique sur Mars en oxydant la matière organique lors de l'analyse par TV-GC-MS des sondes Viking) (Navarro-González *et al.*, 2006), du peroxyde

d'hydrogène H_2O_2 et des perchlorates, possédant de fortes propriétés oxydantes, ont été détectés sur Mars.

Dans le cadre des expériences menées par SAM (mission MSL), la présence d'oxydants inorganiques, tels que des perchlorates ou du H_2O_2 , pourraient empêcher la détection de molécules organiques sur Mars, en causant ou en catalysant une oxydation du MTBSTFA, des molécules organiques, et des produits de la fonctionnalisation, au cours de la réaction de fonctionnalisation.

Perchlorates

Le laboratoire de chimie humide ou « Wet Chemistry Laboratory » (WCL) sur l'atterrisseur Phoenix a réalisé des analyses chimiques aqueuses du sol martien et a mis en évidence une concentration d'environ 10 mM de sels dissous, avec des pourcentages de 0,4 à 0,6% en masse de perchlorate (ClO_4^-). Les anions restants incluaient de faibles concentrations de chlorure, bicarbonate, et possiblement des sulfates. Les cations étaient principalement Mg^{2+} et Na^{2+} , avec de faibles contributions de K^+ et Ca^{2+} (Hecht *et al.*, 2009).

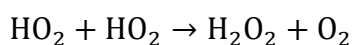
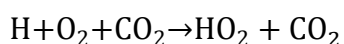
La présence de perchlorate et/ou de chlorate a été confirmée par l'expérience SAM lors d'une analyse EGA au site de Rocknest. Un dégazage d' O_2 a en effet été corrélé au dégazage d'hydrocarbures chlorés, suggérant qu'un oxyde de chlore, tel qu'un chlorate ou un perchlorate, soit la source de l'oxygène et des volatils chlorés (par réaction du chlore martien, fourni par la décomposition de l'oxyde de chlore ; avec des molécules organiques d'origine terrestre, telles que du MTBSTFA issu d'une capsule de fonctionnalisation, et/ou du benzène ou du toluène issus du Tenax au sein du piège d'injection de SAM ; cf. Glavin *et al.*, 2013). Des études de divers chlorates et perchlorates en laboratoire n'ont pas permis d'identifier cette espèce de manière univoque, mais le plus probable serait un Ca-perchlorate (Leshin *et al.*, 2013), plus précisément un perchlorate de calcium hydraté, de formule $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$ (Glavin *et al.*, 2013).

La décomposition de chlorates et perchlorates pourrait également être à l'origine de la détection d' O_2 lors de l'analyse EGA des échantillons de John Klein et Cumberland par SAM (Ming *et al.*, 2014). Du HCl a également été détecté lors des analyses de ces deux échantillons (Ming *et al.*, 2014). Il est possible qu'un perchlorate de magnésium soit à l'origine d'une partie du HCl détecté lors de l'analyse de Cumberland (Sutter *et al.*, 2014).

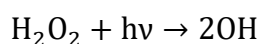
Du chlore a été détecté dans tous les sols analysés sur Mars, *in situ* par les atterrisseurs Viking et depuis l'orbite par Mars Odyssey. Or, on considère que le processus de formation des perchlorates commence grâce à divers processus : l'oxydation du chlore en phase gazeuse dans l'atmosphère ; la production de divers oxydes de chlore grâce à l'interaction entre des électrons (résultant de l'interaction entre le rayonnement cosmique et la glace de surface) ; ou une photo-oxydation hétérogène du chlore de surface, catalysée par des minéraux. Elle pourrait également commencer sur de la poussière aéroportée. La présence de chlore sur l'ensemble de la surface, et la détection de perchlorates dans les poussières à deux emplacements différents (sites d'atterrissages de Phoenix et Curiosity) confirme donc plus avant l'hypothèse selon laquelle les perchlorates sont distribués de manière générale dans le régolithe martien (Leshin *et al.*, 2013).

Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été proposé en tant qu'oxydant de la surface martienne, ayant pu stériliser le sol jusqu'à plusieurs mètres sous la surface. Il pourrait être responsable de l'absence de molécules organiques à la surface de Mars, ainsi que pour la réponse positive de l'expérience « Viking Labeled Release Life Science Experiment » (Encrenaz *et al.*, 2004a). Des modèles photochimiques ont prédit la formation de H_2O_2 dans l'atmosphère martienne, à partir de la combinaison de deux radicaux HO_2 , qui résultent d'une réaction impliquant H , O_2 et CO_2 :



La destruction du H_2O_2 se fait grâce à sa photodissociation en OH :



Les tentatives de détection de H_2O_2 sur Mars ont été infructueuses, jusqu'à sa détection depuis la Terre, par spectroscopie submillimétrique (Clancy *et al.*, 2004) et infrarouge (Encrenaz *et al.*, 2004a).

d) Nouvelle chronologie des temps géologiques martiens

A partir de l'analyse des données récoltées par OMEGA, et afin d'expliquer la nature et la distribution des minéraux observés sur Mars, Bibring *et al.* (2006) proposent trois ères séquentielles caractérisées par des produits d'altération de la surface (Figure I-25):

- (i) une altération aqueuse non acide, mise en évidence par la présence de phyllosilicates : le « phyllosien »,
- (ii) une altération aqueuse acide, mise en évidence par la présence de sulfates : le « theiikien » (du grec ancien *theiikos*, « sulfate »),
- (iii) une altération atmosphérique non aqueuse, mise en évidence par la présence d'oxydes de fer : le « siderikien » (du grec ancien *siderikos*, « ferrique »).

La première ère correspond à la présence de phyllosilicates, toujours observés dans les terrains les plus anciens, ceux du Noachien. Relativement à la période durant laquelle les sulfates se sont déposés, les conditions environnementales du début du Noachien sont beaucoup moins bien comprises. En particulier, on ne sait pas si la formation d'argiles s'est déroulée principalement en surface, ou sous la surface (Bibring *et al.*, 2006).

Comme précisé ci-dessus, la façon dont les phyllosilicates se sont formés sur Mars permettrait d'obtenir des informations sur les conditions environnementales martiennes primitives : climat possiblement aride et froid si les phyllosilicates se sont formés sous la surface ; climat potentiellement plus chaud et humide qu'à présent, et atmosphère primitive dense, si les phyllosilicates se sont formés près de la surface. En effet, un effet de serre important eut été nécessaire afin de maintenir l'eau à l'état liquide. On peut supposer, par analogie avec Vénus (possédant une atmosphère très dense principalement constituée de CO₂) et la Terre (ayant possédé une atmosphère dense de CO₂, dont la présence de calcaires est une conséquence), que Mars a également connu une atmosphère dense et principalement constituée de CO₂ (Bibring and Langevin, 2006). Le changement global vers un environnement acide aurait alors été accompagné d'une chute rapide de la pression atmosphérique. Les observations de preuves géomorphologiques d'écoulements d'eaux à la surface, dont nous avons parlé ci-dessus, ont également conduit à la production de modèles atmosphériques impliquant des pressions de CO₂ 100 à 1000 fois supérieures aux pressions actuelles, ou bien à une composition différente en gaz minoritaires, afin d'aboutir à des pressions et températures plus fortes, nécessitées pour maintenir de l'eau liquide à la surface (Ehlmann *et al.*, 2011). Cependant, il est problématique pour les modèles proposant ces atmosphères denses de produire un effet de serre suffisant, ainsi que d'expliquer ce qu'il est advenu de

l'atmosphère épaisse de CO₂. Un certain nombre de processus peuvent être proposés pour expliquer cette chute de la pression atmosphérique. Le grand bombardement de Mars, étant donnée la faible masse de la planète, aurait pu résulter en une fuite de son atmosphère primitive (Bibring *et al.*, 2006). Le changement global aurait également pu être déclenché par une chute rapide et précoce de la dynamo interne et donc du champ magnétique, entraînant une érosion de l'atmosphère par le vent solaire (Bibring *et al.*, 2006). De nos jours, Mars ne possède pas de champ dipolaire global. Cependant, un magnétisme rémanent a été détecté dans les terrains cratérisés de la croûte martienne par la sonde MGS de la NASA, ce qui indiquerait que la croûte s'est solidifiée en présence d'un champ magnétique. Au sein des unités volcaniques les plus anciennes, sur le dôme de Tharsis et dans les plaines du Nord, aucun magnétisme rémanent n'a été détecté. La dynamo de Mars se serait donc arrêtée de manière précoce, avant les premières manifestations volcaniques, quelques centaines de millions d'années au plus après sa formation (Bibring and Langevin, 2006). Un piégeage du CO₂ au sein de carbonates, glace, ou clathrates, ont également été proposés, bien que les estimations actuelles indiquent que ces flux de pertes sont insuffisants, et que le piégeage par des réservoirs ne peut contenir au plus que quelques dizaines de millibars de CO₂ (Ehlmann *et al.*, 2011). Par conséquent, des modèles alternatifs ont proposé un climat primitif martien continuellement froid et aride, avec une faible pression atmosphérique et des systèmes hydrologiques gouvernés par l'eau souterraine (Ehlmann *et al.*, 2011).

L'étude d'Ehlmann *et al.* (2011) semble confirmer une formation importante d'argiles martiennes sous la surface, par circulation, et interaction avec les roches Noachiennes, d'eau souterraine hydrothermale (températures comprises entre la température ambiante et 400°C), à faible ratio volumique d'eau par rapport à la roche. Cette interprétation est déduite du type de phyllosilicates observés sur Mars (phyllosilicates de Fe et Mg), typiques de l'altération aqueuse d'un basalte en système chimiquement clos (non communicants avec l'atmosphère) et avec un ratio eau / roche faible. Les causes d'une circulation hydrothermale d'eau souterraine ont pu être les suivantes : de larges impacts (spécialement durant le grand bombardement), du volcanisme intrusif et extrusif étendu, et un gradient géothermique plus étendu que de nos jours (Ehlmann *et al.*, 2011). Des conditions froides et arides, avec seulement quelques épisodes passagers d'eau de surface, pourraient donc avoir été caractéristiques de la surface de Mars pendant plus de 4 Ga, depuis le début du Noachien. Dans ce modèle, la Mars primitive chaude et humide (relativement aux conditions actuelles)

aurait été sous la surface, et les environnements aqueux potentiellement habitables les plus étendus dans le temps auraient donc pu se trouver également sous la surface. Par la suite, au cours de la fin du Noachien / début de l'Hespérien, le volcanisme était largement répandu, et les eaux de surface ont pu, par intermittence, creuser des vallées, former des lacs, transporter des sédiments vers des bassins, et ont pu entretenir une météorisation et donc une formation d'argiles plus près de la surface. Les conditions depuis la fin de l'Hespérien jusqu'à nos jours ont été froides et sèches, résultant en la cessation de la formation d'argiles (Ehlmann *et al.*, 2011). Récemment, des environnements aqueux ayant conduit à la formation d'argiles ont été détectés à la fois sous la surface (Arvidson *et al.*, 2014; dans Grotzinger, 2014) et en surface (Grotzinger *et al.*, 2014; Vaniman *et al.*, 2014).

La transition entre les deux premières ères (Phyllosien et Theiikien) s'est déroulée tôt dans l'histoire de la planète et pendant un épisode critique de changement climatique global. Ce changement s'est opéré d'un environnement alcalin, possiblement humide (favorable à la formation d'argiles), vers un environnement acide (favorable à la formation de sulfates). Ce changement a été causé par le dégazage important d'espèces volatiles, incluant le soufre, lié à l'activité volcanique qui a modelé la surface de Mars (Bibring *et al.*, 2006) et qui aurait accompagné la formation du mont Tharsis et le remplissage des plaines du Nord, quelques centaines de millions d'années après la formation de la planète. De grandes quantités d'espèces soufrées dans l'atmosphère aurait alors conduit à des conditions acides. L'apparition, en des endroits spécifiques de la surface, de nappes d'eau, aurait formé des dépôts de sulfates, avant de disparaître par percolation et évaporation (Bibring and Langevin, 2006). Si les phyllosilicates se sont formés sous la surface, comme discuté ci-dessus, alors ces épisodes auraient été les seuls permettant la présence ponctuelle d'eau liquide à la surface d'une Mars froide et aride.

La troisième ère (le sidérikien), qui est l'ère actuelle, est dominée par la lente altération atmosphérique du régolithe en oxydes ferriques anhydres (Bibring and Langevin, 2006). La formation de ce produit d'altération pourrait résulter de réactions gaz/solide (comme la météorisation atmosphérique), principalement à cause de peroxydes ; voire à cause d'interactions roche/glace (Bibring *et al.*, 2006). Cette altération serait lente du fait de la faible concentration atmosphérique en H_2O_2 , sous réserve que les teneurs atmosphériques actuelles en H_2O_2 soient représentatives de l'ensemble du sidérikien (Bibring *et al.*, 2006). Cette altération atmosphérique est également responsable de la présence de minéraux mafiques

non altérés dans les zones récemment apportées à la surface (par impact ou érosion), ou constitués de terrains anciens de haute altitude, qui ont été exposés à une atmosphère fortement réduite en activité peroxydique (Bibring and Langevin, 2006).

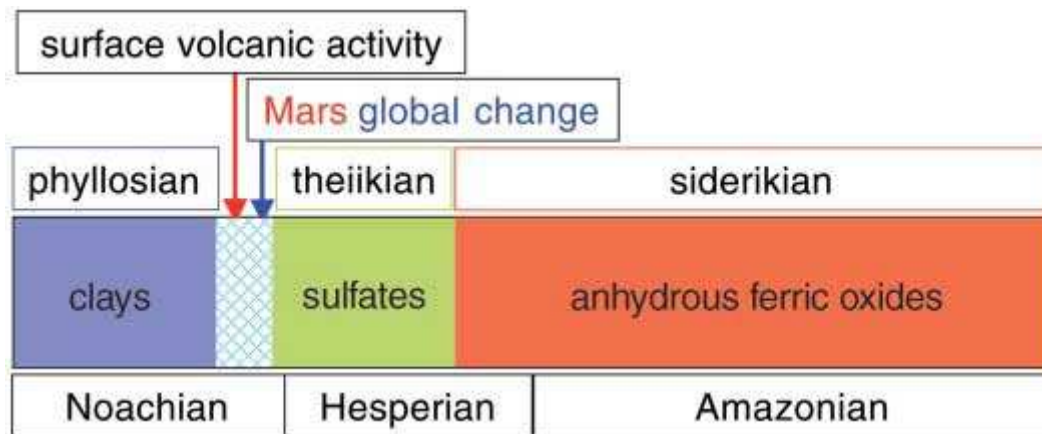


Figure I-25 : chronologie des temps géologiques martiens, selon Bibring *et al.* 2006, et selon la datation basée sur la densité des cratères d'impact (source: Bibring *et al.*, 2006)

1.3.6.4) L'exobiologie martienne

a) Implications de l'histoire géologique martienne pour la recherche de traces de vie sur Mars

Pour expliquer la nature et la distribution des minéraux observés sur Mars, le principal modèle est divisé en trois périodes (*cf.* paragraphe 1.3.6.3.d) : (i) le Noachien / Phyllosien; (ii) l'Hespérien / Théiikien ; et (iii) l'Amazonien / Sidérikien.

L'ère durant laquelle Mars aurait été le plus à même de posséder des conditions permettant l'habitabilité est la première (Noachien / Phyllosien), mise en évidence par la présence de phyllosilicates, que l'eau ayant permis leur formation ait été présente à la surface, ou en profondeur. Bien que l'on présente Mars et la Terre comme des jumelles, leurs évolutions ont divergé très tôt dans leur histoire. Cependant, il n'est pas impossible que la vie soit apparue sur Mars entre sa formation et la disparition des conditions propices à sa survie, c'est-à-dire lors de la présence d'eau liquide stable pendant de longues périodes. Les régions les plus favorables ne se trouvent pas, comme on pourrait s'y attendre, à proximité des structures formées par l'eau (lacs, réseaux de vallées, chenaux d'écoulement), mais plutôt

dans des terrains anciens se trouvant aujourd'hui exposés à la surface à la suite d'impacts ou d'érosion, et comportant des phyllosilicates. Si des organismes vivants sont apparus, les sites contenant des argiles auraient pu être ceux dans lesquels le développement biochimique aurait pu prendre place. Par la suite, le faible niveau d'altération de surface, sous une atmosphère ténue, aurait pu préserver la plus grande partie des traces de molécules ou de structures d'origine biologique dans les roches de surface ou de sous-surface riches en argiles. Ces zones de haut potentiel d'habitabilité représentent des cibles intéressantes dans le cadre de l'exploration *in situ* de Mars (Bibring *et al.*, 2006), car elles pourraient constituer des lieux adéquats pour la recherche d'indices de vie passée ou présente sur la planète rouge.

b) Histoire de l'exobiologie martienne

A la fin du 19^{ème} siècle, des anciennes observations télescopiques de la planète ont révélé des structures en forme de canaux sur la surface, et leur présence fut pendant un temps attribuée à une forme de vie intelligente martienne. Ceci inspira de nombreux ouvrages de fiction (Figure I-26).

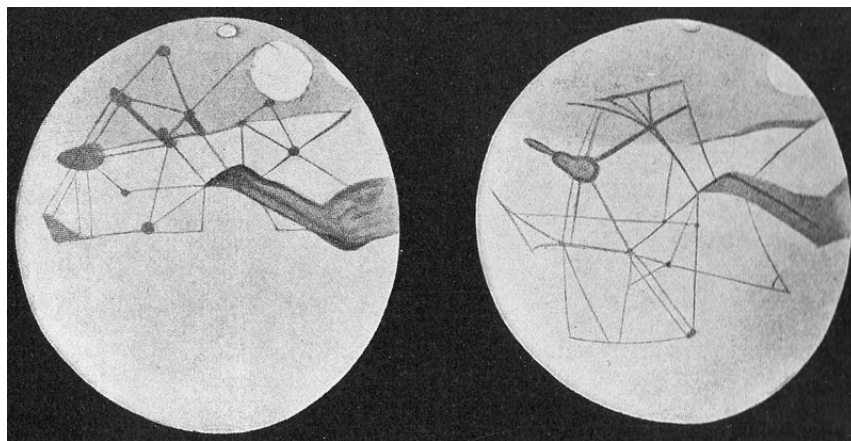


Figure I-26 : Dessin de Mars représentant les structures en formes de canaux observés à sa surface
(dessin par Percival Lawrence Lowell)

Les premières expériences exobiologiques à être réalisées sur Mars le furent par les deux atterrisseurs des missions Viking 1 et 2 en 1976. Aucune molécule organique ne fut détectée par les instruments (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie

de masse), et une perte d'intérêt pour la planète rouge s'ensuivit. En 1996, l'intérêt exobiologique fut relancé par la découverte supposée de fossiles attribués à des nanobactéries sur la météorite martienne ALH84001 (McKay *et al.*, 1996). La présence de grandes quantités d'eau dans le passé de Mars, mise en évidence par l'instrument OMEGA de la sonde Mars Express (Bibring *et al.*, 2006), représente un indice de plus en la faveur de la possibilité de l'émergence d'une vie dans l'histoire primitive de Mars. Comme précisé au paragraphe 1.2.3 (signatures métaboliques), il a également été détecté du méthane sur Mars (notamment sous forme de panaches) (Atreya *et al.*, 2007; Fonti and Marzo, 2010; Formisano *et al.*, 2004; Geminale *et al.*, 2011; Krasnopolsky, 2012, 2011; Mumma *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2013). Bien que certaines analyses *in situ* à bord de Curiosity n'aient pas pu confirmer la présence de méthane (Webster *et al.*, 2013), des analyses plus récentes ont permis de mettre en évidence du méthane, produit épisodiquement par une source inconnue, pouvant être d'origine biotique ou abiotique (Webster *et al.*, 2015). Du fait de sa proximité et des conditions environnementales primitives similaires à celles de la Terre, Mars représente un objet de grand intérêt exobiologique. De plus, contrairement à la Terre, le passé géologique de Mars n'a pas été effacé par la tectonique des plaques. Même si la vie n'est jamais apparue sur Mars, on devrait pouvoir y détecter *in situ* des molécules organiques, apportées par les météorites, astéroïdes et leurs fragments : les apports de carbone réduit à la surface de Mars par le biais des météorites seraient de l'ordre de $2,4 \times 10^8$ g/an (Benner *et al.*, 2000). Cependant, les conditions environnementales martiennes sont hostiles à la conservation de molécules organiques à sa surface : aridité, acidité des sols, rayonnements ultraviolets, rayonnements gamma, présence d'oxydants puissants (Kminek and Bada, 2006; Quinn *et al.*, 2005). Sous la surface, cependant, des molécules organiques auraient pu être conservées, à l'abri des oxydants et des radiations (Mancinelli, 2000). Certains suggèrent même l'existence d'une biosphère souterraine (Summers *et al.*, 2002). De plus, certains minéraux, détectés à la surface de Mars (par exemple, voir (Arvidson *et al.*, 2005; Bibring *et al.*, 2005; Ehlmann *et al.*, 2008), en plus de fournir des informations sur les conditions environnementales passées, pourraient potentiellement préserver des biomarqueurs ou des bioindices : par exemple les sulfates, les carbonates et les phyllosilicates (Summons *et al.*, 2011). Sur Terre, par exemple, les carbonates déposés par le métabolisme microbien détiennent parfois la signature l'origine biotique de ce procédé (par exemple, (Birgel *et al.*, 2008).

Comme discuté plus avant, la non-détection de molécules organiques par les sondes Viking en 1976 pourrait être causée par la présence d'un oxydant puissant dans le régolithe martien qui convertirait rapidement les molécules organiques (apportées sur Mars par le biais des comètes, astéroïdes et leurs fragments) en CO₂. Benner *et al.* (2000) proposent que des sels réfractaires d'acides benzène carboxyliques, et peut-être de l'acide oxalique et de l'acide acétique, devraient être présents en tant qu'intermédiaires métastables de la dégradation des molécules organiques sous les conditions oxydantes martiennes. Cependant, les sels de ces acides organiques n'ont pas été détectés par les CPG-SM des sondes Viking (Tableau I-1). Toutefois, les processus de dégradation supposés par Benner semblent validés par des résultats d'une étude postérieure basée sur un analogue du sol martien, le sol d'Atacama (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2002).

Substance	Concentration (parts per million)	Metastable Products
Acid insoluble kerogen	14500	Benzenecarboxylic acids
Aliphatic hydrocarbons	12–35	Acetate
Aromatic hydrocarbons	15–28	Benzenecarboxylic acids
Monocarboxylic acids	≈330	Acetate/oxalate
2-Hydroxycarboxylic acids	14.6	Acetate/carbonate
Alcohols (primary)	11	Acetate
Aldehydes	11	Acetate
Ketones	16	Acetate, benzenecarboxylic acids
Amines	10.7	Acetate
Urea	25	Carbonate
Heterocycles	12	Carbonate, other products

Tableau I-1 : produits métastables attendus suite à la dégradation de matériel organique trouvé dans la météorite de Murchison (source: Benner *et al.*, 2000)

La mission MSL de la NASA, lancée en novembre 2011, a pour but d'évaluer si les conditions sur Mars ont un jour été favorables à la vie microbienne et à la préservation d'indices d'une vie passée dans les roches martiennes. Le rover Curiosity s'est posé sur Mars le 6 août 2012. A son bord, l'expérience SAM est un ensemble d'instruments capable d'analyser la composition chimique et isotopique de l'atmosphère et de molécules volatiles extraites d'échantillons solides. SAM inclue un spectromètre de masse quadrupolaire, un spectromètre laser ajustable, et un chromatographe en phase gazeuse équipé de six colonnes chromatographiques. Cet ensemble analytique permet de déterminer les ratios isotopiques d'éléments clefs, et de séparer et d'identifier une large gamme de composés carbonés volatils

directement à partir de l'atmosphère, ou suite à leur libération grâce au chauffage d'échantillons solides. Les ratios isotopiques permettent d'obtenir des indices concernant l'histoire de l'atmosphère et de l'eau sur Mars. En plus de sa capacité d'analyse des composés inorganiques simples et des gaz nobles, SAM est capable de rechercher des composés organiques grâce à pyrolyse ou une extraction chimique (fonctionnalisation des molécules organiques réfractaires). Cette étape est réalisée au préalable sur des échantillons de sol. Le tableau I-2 présente une liste de biomarqueurs / bioindices qui pourraient être détectés par MSL, en considérant à la fois la pertinence de cette biosignature, et la manière dont elle peut être mesurée par MSL. Comme précisé au paragraphe 1.2.4.2), la présence simultanée de plusieurs bioindices pourrait constituer un biomarqueur.

<i>Biosignatures detectable by MSL</i>	<i>How definitive as a biosignature?</i>	<i>How well can it be measured by MSL?</i>
biogenic organic molecules	highly definitive	readily with SAM
biogenic gases	often definitive	readily with SAM
body fossils	often definitive	with MAHLI if large enough
Biofabrics	sometimes definitive	with MAHLI, MastCam
stable isotopic compositions	occasionally; context critical	readily with SAM
biomineralization/alteration	rarely definitive	detectible with CheMin, ChemCam
spatial chemical patterns	rarely definitive	detectible with CheMin, ChemCam

Tableau I-2 : différentes biosignatures qui pourraient être détectées par MSL (source : Summons *et al.*, 2011)

Jusqu'à présent, la mission MSL a permis de confirmer la présence de méthane sur Mars, ce méthane étant produit de manière épisodique et par une source inconnue, pouvant être biotique ou abiotique (Webster *et al.*, 2015). Elle a également permis de mettre en évidence de l'eau, sous forme liée au sein de minéraux (Leshin *et al.*, 2013; Ming *et al.*, 2014; Vaniman *et al.*, 2014), et a permis de montrer que les conditions au sein du cratère Gale sont favorables à la présence temporaire d'eau sous forme libre et liquide (Martín-Torres *et al.*, 2015). De plus, MSL a également permis de montrer qu'un environnement habitable a anciennement existé à Yellowknife Bay (cratère Gale), où l'eau coulait depuis la bordure du cratère et se rassemblait au sein d'une dépression curviligne à la base du mont central du cratère, pour former un système hydrologique qui aurait pu perdurer pendant des millions d'années (Grotzinger *et al.*, 2014; dans Grotzinger, 2014). Finalement, lors de l'analyse d'échantillons de sol sur le site de Rocknest, quelques composés organiques simples (dont du chlorométhane, du dichlorométhane, du trichlorométhane, du chlorométhylpropène, et du

chlorobenzène) ont été détectés, mais leur origine martienne n'est pas encore élucidée (Leshin *et al.*, 2013). En effet, des études au laboratoire suggèrent que la réaction du chlore martien (fourni par la décomposition d'un oxyde de chlore d'origine martienne, tel qu'un perchlorate) avec le MTBSTFA (issu d'une capsule de fonctionnalisation) lors de la pyrolyse pourrait expliquer la détection des trois chlorométhanés et du chlorométhylpropène. La présence de chlorobenzène pourrait quant à elle être causée par la réaction du chlore martien avec du benzène ou du toluène d'origine terrestre, issu de l'oxyde de 2,6-diphénylphénylène (Tenax) du piège d'injection de SAM (Glavin *et al.*, 2013).

L'exploration de la planète rouge ne s'arrête pas là. L'expérience ExoMars de l'ESA comprend un rover (Pasteur) qui devrait atterrir en 2018. Les objectifs scientifiques de cette mission sont de rechercher des signes d'une vie passée ou présente sur Mars, de caractériser l'environnement géochimique en fonction de la profondeur dans la subsurface, d'étudier l'environnement de surface dans le but d'estimer la faisabilité de futures mission habitées, et d'investiguer l'intérieur de la planète dans le but de mieux comprendre l'évolution et l'habitabilité de Mars. Le rover sera capable de forer jusqu'à deux mètres de profondeur, permettant d'atteindre une profondeur où de possibles molécules organiques auraient eu plus de chances d'être conservées. L'instrument MOMA (Mars Organic Molecule Analyzer) permettra d'analyser la matière organique réfractaire et de déterminer les ratios énantiomériques de molécules organiques si elles sont trouvées. Le but envisagé à plus long terme (programme Aurora) est de ramener des échantillons martiens sur Terre afin de les analyser de manière plus exhaustive (Mars Sample Return).

1.3.7) Conclusion

La recherche de signatures de vie passée ou présente est primordiale pour obtenir des éléments de réponse aux questions de l'origine de la vie sur Terre et de la présence potentielle d'une vie ailleurs. Il existe de nombreux milieux extraterrestres où chercher, du milieu interstellaire – par spectroscopie – aux météorites, en passant par les planètes du système solaire, grâce aux sondes et aux rovers qui y réalisent des mesures *in situ*. La recherche de bioindices se concentre entre autres sur Mars et les météorites. Les moyens déployés pour

l'analyse de Mars s'expliquent d'une part sa facilité d'accès, comparativement à d'autres corps du système solaire ; et d'autre part car les conditions requises pour l'apparition de la vie telle qu'on la connaît y étaient réunies à l'époque où l'on pense que la vie est apparue sur Terre. Les météorites sont intéressantes car on pense qu'elles ont contribué à l'apport de molécules organiques aux planètes telluriques, dont la Terre primitive. Ce matériel prébiotique pourrait avoir été le point de départ de la vie. Parmi les nombreux bioindices recherchés, les acides aminés sont fortement étudiés. En effet, leur importance dans le fonctionnement des êtres vivants, le fait qu'ils soient retrouvés en abondance dans les météorites, et qu'ils présentent des propriétés permettant de différencier leur origine biotique ou abiotique leur donne un caractère d'importance dans la recherche de traces de vie. Après avoir listé les molécules organiques cibles, nous allons nous pencher plus particulièrement sur les méthodes d'extraction, d'analyse et de fonctionnalisation permettant la recherche et l'analyse de molécules organiques – dont les acides aminés – sur Mars et sur les météorites.

1.4) Comment chercher : les méthodes d'extraction, d'analyse et de fonctionnalisation

De nombreuses techniques sont utilisées en chimie analytique pour l'extraction et l'analyse de molécules organiques. Cependant, en fonction de l'objet analysé, différentes techniques sont utilisées. L'extraction par solvant puis la séparation, détection, identification et quantification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique particulièrement utilisée pour l'analyse *in situ*, mais également en laboratoire. L'extraction permet d'accéder aux molécules organiques généralement contenues dans des matrices difficiles d'accès (échantillons solides). Une étape de fonctionnalisation est souvent nécessaire afin de pouvoir analyser les molécules organiques cibles les plus polaires.

1.4.1) Les techniques d'extraction

Les techniques de séparation consistant à extraire la matière organique à partir de matrices solides sont couramment utilisées afin d'extraire des molécules organiques (comme

les acides aminés, acides carboxyliques, bases azotées) contenues dans différents types de matrices, dont les matrices minérales (comme les analogues du régolithe martien, ou encore les météorites). De nombreux facteurs influencent le choix d'une technique d'extraction : son efficacité, sa simplicité d'utilisation, la présence ou non de solvant (et par conséquent sa quantité si présent), le coût énergétique et financier. Ces facteurs prennent une tout autre importance quand il s'agit d'analyse *in situ* et à fortiori sur d'autres planètes que la terre. L'utilisation *in situ* entraîne des restrictions plus importantes que l'utilisation au laboratoire (il faut réduire la masse et le volume des instruments, ainsi que leurs coûts énergétiques, tout en maximisant l'efficacité de la technique), et l'éventail de techniques disponibles pour la spatialisation s'en trouve ainsi réduit.

L'extraction est une des étapes clefs de la préparation de l'échantillon (d'autres étapes incluent la purification et la concentration). La préparation de l'échantillon, en amont de l'analyse, est importante car elle influe sur l'efficacité et le résultat de l'analyse, et cela d'autant plus si les molécules organiques se trouvent à l'état de traces dans l'échantillon. La répétabilité et la reproductibilité sont deux autres paramètres à prendre en compte dans le choix de la technique.

Les méthodes d'extraction suivantes ont été ou seront utilisées dans le cadre de la recherche de bioindices dans des météorites, et dans des environnements extraterrestres et leurs analogues (ceci n'est pas une liste exhaustive). Elles incluent les extractions avec solvant et les extractions sans solvant.

1.4.1.1) Méthodes d'extraction avec solvant

a) Extraction solide – liquide

L'extraction solide – liquide simple (au contraire de l'extraction utilisant des molécules actives appelés « extractants ») consiste en l'ajout d'un solvant à une matrice solide. Les molécules organiques cibles, possédant une affinité avec le solvant, sont alors extraites de la matrice par différence d'affinité entre les deux matrices (solide et liquide). L'exemple le plus courant de l'utilisation de cette technique dans le domaine de l'exobiologie est l'extraction des molécules organiques, telles que les acides aminés, contenues dans des météorites. Pour ce faire, de l'eau est ajoutée à un échantillon broyé de météorite, le mélange est en général

porté à 100°C durant 24h (*cf.* paragraphe 1.4.1.3). Cette technique est également utilisée pour les analogues de sol martien (*e.g.*, Martins *et al.*, 2011).

D'autres solvants que l'eau peuvent être utilisés, tels que des solvants organiques (*e.g.* propanol, acétate d'éthyle) (*e.g.*, Buch *et al.*, 2003). L'utilisation de solvants organiques à la place de l'eau présente plusieurs intérêts. Ils permettent en premier lieu l'extraction de composés de polarité intermédiaire (l'eau, solvant fortement polaire, possède une constante diélectrique de 78,3 à 25°C, *cf.* Malmberg and Maryott, 1956). D'autre part, dans le cadre de la recherche de molécules organiques sur Mars, cela permet d'éviter la pollution de l'environnement martien par de l'eau provenant de l'instrument (la recherche d'eau est l'un des objectifs importants de l'exploration martienne).

b) Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons permet de faciliter l'extraction de molécules organiques à partir d'une matrice solide dans un solvant. Lors de la sonication à haute intensité (25 à 50 kHz) d'un liquide, les ondes sonores se propagent dans le liquide et génèrent des vibrations mécaniques, résultant en des cycles alternant des phases de haute pression (compression) et basse pression (raréfaction). Durant la phase de basse pression, les ultrasons de haute intensité entraînent la formation de bulles, qui s'effondrent ensuite pendant la phase de haute pression. Ce phénomène est appelé la cavitation. Lors de l'implosion, de très fortes températures (environ 5000°K) et pressions (environ 2000 atm) sont atteintes localement.

Cette technique a été utilisée pour extraire des acides aminés et des acides carboxyliques à partir d'un sable de Fontainebleau dopé, ainsi qu'à partir d'un sol du désert d'Atacama au Chili, un analogue martien (Buch *et al.*, 2006). Elle a également permis l'extraction de bases azotées à partir de la météorite Murchison (Martins *et al.*, 2008).

c) Extraction par eau sous-critique

En portant l'eau à des températures et pressions spécifiques, elle se comporte comme un fluide sous-critique. L'eau sous-critique est de l'eau chauffée entre son point d'ébullition et sa température critique (647°K), conservée à l'état liquide grâce à une pression élevée. Dans ces conditions, la constante diélectrique de l'eau change (elle diminue lors d'une

augmentation de la température), permettant l'extraction de molécules moins polaires. Cette technique permet donc l'extraction d'une plus large gamme de composés organiques.

L'extraction par eau sous-critique a notamment été utilisée pour l'extraction d'acides aminés à partir d'un sol d'Atacama (Amashukeli *et al.*, 2007). Une extraction par eau sous-critique devait être mise en œuvre sur le sol martien, grâce au « SubCritical Water Extractor », SCWE, sous-système originellement présent dans la suite d'instruments Urey sur le rover Pasteur (mission ExoMars 2018). Cette suite d'instruments n'est désormais plus incluse dans la charge utile du rover Pasteur.

d) Extraction par fluide supercritique (SFE)

Un fluide supercritique est un fluide chauffé et comprimé au-delà de sa température critique et de sa pression critique. Cet état permet à une substance de posséder des propriétés intermédiaires entre celles de ses états gazeux et liquides. L'extraction est alors rapide, grâce à la faible viscosité et la forte diffusivité du fluide supercritique. L'extrait est facilement récupéré en diminuant la pression, ce qui permet au solvant de retourner à l'état gazeux. Le CO₂ supercritique est le solvant supercritique le plus commun, il est par exemple utilisé pour décaféiner le café ou produire des huiles essentielles.

L'extraction par fluide supercritique (« Supercritical Fluid Extraction », SFE) a été utilisée pour l'extraction d'hydrocarbures à partir des météorites Murchison (Sephton *et al.*, 1998), et Orgueil et Cold Bokkeveld (Sephton *et al.*, 2001). Le CO₂ pourrait être utilisé sur Mars en tant que solvant supercritique pour l'extraction de composés organiques d'intérêt exobiologique. Le CO₂ serait prélevé sur place, dans l'atmosphère martienne, éliminant les désavantages liés à l'apport de solvants sur Mars. Ceci est envisagé dans le cadre d'un projet de la NASA (Zhong, 2014).

e) Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (« Solid Phase Extraction », SPE) est une technique analogue à la chromatographie et permet de retenir des composés cibles, issus d'une matrice liquide, sur une matrice solide adsorbante. Les composés interférents sont élués avant les

composés cibles (retenus par la matrice solide et élués ensuite grâce à un autre solvant). L'inverse est également possible.

Cette technique est largement utilisée au cours du protocole d'analyse des acides aminés dans les météorites, non pas pour les extraire, mais pour purifier l'échantillon grâce à une résine échangeuse de cations qui retient les acides aminés et permet l'élution de toutes les molécules organiques non-cationiques et les anions métalliques. Ceci permet d'éviter les interférences lors de la réaction de fonctionnalisation nécessaire à l'analyse des acides aminés.

f) Micro-extraction en phase solide

La micro-extraction en phase solide (« Solid Phase MicroExtraction », SPME) utilise une aiguille recouverte d'une phase extractante, permettant l'extraction de molécules organiques à partir d'un échantillon gazeux ou liquide. L'aiguille est ensuite insérée dans l'injecteur d'un instrument de séparation, tel qu'un CPG, où la température élevée de l'injecteur permet de désorber les analytes.

Cette technique a été utilisée pour l'extraction de HAP en phase liquide, après extraction par ultrasons d'analogues de sol martien (Orzechowska *et al.*, 2011).

1.4.1.2) Méthodes d'extraction sans solvant

a) Désorption/ionization laser

La désorption/ionization laser (« Laser Desorption », LD) permet de désorber et d'ioniser des molécules organiques et des biomolécules à partir d'échantillons condensés. Grâce à cette technique, il est possible de désorber des molécules organiques labiles et de haut poids moléculaire et d'obtenir leurs ions moléculaires à de faibles irradiances. C'est une technique d'ionisation douce qui est couplée à la spectrométrie de masse (« Laser Desorption – Mass Spectrometry », LD-MS). Contrairement aux techniques d'ionisation plus conventionnelles (spectrométrie de masse), elle permet de ne transférer qu'une faible

quantité d'énergie d'excitation aux ions moléculaires désorbés, ce qui conduit à une fragmentation faible ou inexistante (Karas and Bahr, 1986).

La LD-MS est une technique efficace pour l'analyse de PAH dans des échantillons cosmogéochimiques (*e.g.* météorites, dépôts d'impacts, *etc.*) au niveau sub-ppm. Elle a permis de détecter des PAH dans des météorites martiennes de l'Antarctique, dont ALH84001 (Becker *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 1996), ainsi que dans des chondrites carbonées, et de la glace polaire (Becker *et al.*, 1997).

La désorption-ionisation laser peut être assistée par matrice (« Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization », MALDI). Un faisceau laser UV permet la désorption et l'ionisation des molécules cibles, qui ont au préalable été déposées sur une matrice solide absorbante dans le domaine UV. La MALDI sera utilisée par l'instrument MOMA sur le rover Pasteur de la mission ExoMars 2018.

b) Pyrolyse et hydropyrolyse

La pyrolyse est une technique (destructrice) de thermolyse (décomposition chimique causée par la température) en absence d'oxygène. Elle est souvent utilisée pour décomposer thermiquement de la matière organique macromoléculaire, sous atmosphère inerte, en des fragments de plus faible poids moléculaire, ce qui facilite leur analyse par les techniques conventionnelles d'analyse des gaz.

Couplée à la CPG-SM (Py-CPG-SM ou TV-CPG-SM), elle est beaucoup utilisée en laboratoire mais également pour l'exploration spatiale. La Pyr-CPG-MS a ainsi été utilisée pour la recherche de composés organiques sur Mars (mission Viking, 1976) et dans l'atmosphère de Titan (mission Cassini-Huygens, 2004). Elle est utilisée sur la comète 67P/Tchourioumov-Guerassimenko (instrument COSAC) et sur Mars (Curiosity, mission MSL), et le sera à nouveau sur Mars dans le futur (instrument MOMA, mission ExoMars 2018).

L'hydropyrolyse consiste en une pyrolyse en présence de fortes pressions d'hydrogène et une phase dispersée et catalytiquement active de sulfure de molybdène. Elle a été utilisée pour l'extraction de PAH à partir de la phase macromoléculaire carbonée insoluble (résistante à l'extraction par solvant) de la météorite Murchison (Sephton *et al.*, 2005, 2004).

c) Thermochemolyse

La thermochemolyse est une technique réalisant une pyrolyse en présence d'un réactif de fonctionnalisation tel que le tetraméthylammonium (TMAH). L'ajout de ce réactif permet de protéger les composés thermolabiles et séparer par chromatographie les composés polaires et non polaires en une seule analyse. La pyrolyse en présence de TMAH permet une coupure efficace des liaisons polaires et la méthylation subséquente des groupements COOH, OH et NH₂, facilitant l'analyse par CPG (Geffroy-Rodier *et al.*, 2009).

Des hydrocarbures aromatiques ont été détectés suite à la thermochemolyse au TMAH de la MOI des météorites Orgueil et Murchison (Remusat *et al.*, 2005). Elle a été utilisée sur le sol d'Atacama, analogue de sol martien, et a permis de mettre en évidence des lipides et des carbohydrates (Geffroy-Rodier *et al.*, 2009). Elle est utilisée sur MSL afin de détecter la présence potentielle de molécules polaires liées au sein de molécules organiques plus complexes (par exemple des acides aminés au sein de protéines, des acides gras au sein de membranes, ou des acides carboxyliques au sein de macromolécules abiotiques) (Mahaffy *et al.*, 2012) et sera utilisée sur ExoMars 2018.

d) Thermodésorption / sublimation

La thermodésorption (« thermal desorption » en Anglais) consiste à chauffer un échantillon à température modérée afin d'en extraire les composés organiques. Elle a permis, par exemple, d'extraire des biphényles polychlorés (PCB) à partir de sols, à basse pression et dans la gamme de températures de 350°C à 450°C (Risoul *et al.*, 2002). La sublimation sous conditions ambiantes martiennes, couplée à une fonctionnalisation chimique, a également été utilisée pour extraire des bases nucléiques issues de la bactérie *Escherischia coli*, ainsi qu'un échantillon de sédiment marin, de l'eau de mer, et d'un sol d'Atacama (Glavin *et al.*, 2006).

1.4.1.3) Focus sur les météorites et l'hydrolyse acide

Comme précisé dans le paragraphe 1.3.5), les chondrites carbonées auraient pu représenter une source importante de molécules prébiotiques nécessaires à l'apparition de la

vie sur la Terre primitive. Le carbone représente une part non négligeable du poids de ces météorites primitives. La majorité du carbone organique est sous la forme d'une macromolécule insoluble dont la structure complexe ressemble à celle du kérogène, et le reste du carbone organique est extractible et est constitué d'un mélange complexe de molécules organiques, dont des acides aminés, bases azotées et acides carboxyliques.

Les acides aminés et les autres molécules organiques solubles dans l'eau sont habituellement analysés grâce à une extraction à l'eau suivie d'une hydrolyse acide de l'extrait aqueux.

Cette procédure a pour la première fois été utilisée pour l'analyse des acides aminés présents dans des échantillons de sol lunaires, collectés durant la mission Apollo 11 (Fox *et al.*, 1970; Hare *et al.*, 1970). Les auteurs ont proposé l'hydrolyse acide, car selon eux, les acides aminés dans ce type d'échantillon (*i.e.* volcanique) sont majoritairement ou entièrement sous forme polymérisée. A l'époque, l'hydrolyse acide était vue comme la technique standard pour l'analyse des acides aminés des protéines (technique décrite par Moore and Stein, 1963). Dans ce cadre, l'acide chlorhydrique (HCl) était utilisé pour deux raisons : il permet un taux de clivage des liaisons peptidiques supérieur à l'acide sulfurique de même concentration, et il peut être retiré du mélange d'acides aminés par évaporation (Light and Smith, 1963). Hare *et al.* (1970) ont proposé de réaliser l'hydrolyse acide non pas directement sur l'échantillon de sol, mais sur un extrait aqueux de cet échantillon. Ils ont proposé cette méthode en se basant sur leurs expériences d'analyse d'échantillons géologiques, pour lesquelles les acides aminés sont observés en réalisant une hydrolyse de l'extrait aqueux, alors qu'ils ne sont pas observés lorsque l'échantillon est hydrolysé directement, ce qui est probablement dû à une décomposition catalysée par les fortes proportions de minéraux en présence de HCl chauffé ; ainsi que pour éviter la production de grandes quantités de sels, lors du chauffage de HCl en présence du sol lunaire (Hare *et al.*, 1970). Cette technique a ensuite été utilisée pour l'analyse des acides aminés au sein de la météorite Murchison (Kvenvolden *et al.*, 1970), et est devenue la référence pour l'analyse en laboratoire des acides aminés et autres molécules organiques dans les matrices extraterrestres (*e.g.* météorites, poussières lunaires) et leurs analogues (*e.g.* analogues du sol martien, analogues de glaces interstellaires).

Par la suite, une amélioration de la méthode d'hydrolyse acide de Moore and Stein (1963) a été proposée, amélioration consistant à réaliser l'hydrolyse en phase gazeuse (Tsugita *et al.*, 1987) — technique déjà proposée par la méthode Pico-Tag de la société Waters

(Bidleingmeyer *et al.*, 1984) — au lieu de la phase liquide. Cette méthode est plus rapide (22,5 / 45 minutes au lieu de 24h), plus adaptée à l'hydrolyse d'une faible quantité d'échantillon (Ozols, 1990) et permet de limiter la contamination de l'échantillon (*e.g.*, Knecht and Chang, 1986), car seul le HCl en phase vapeur entre en contact avec l'échantillon, ce qui exclue les contaminants non-volatils (Ozols, 1990). Elle a été utilisée pour la première fois sur les météorites par Glavin *et al.* (1999), avec une durée d'hydrolyse plus longue (3h au lieu de 22,5 / 45 minutes pour Tsugita *et al.*, 1987 ; et 1h pour la méthode Pico-Tag). Elle est maintenant couramment utilisée pour l'analyse des acides aminés météoritiques (*e.g.*, Glavin *et al.*, 2010).

a) 1^{ère} étape : extraction à l'eau

Les échantillons sont tout d'abord réduits à l'état de poudre en utilisant un mortier et un pilon stériles. Entre 0,1 et 1g de poudre est ajoutée à une ampoule stérile, et de l'eau est ajoutée avec un ratio massique de 2 : 1 à 4 : 1 (Burton *et al.*, 2012b). L'ampoule est scellée et placée au four pour extraction. Le temps et la température de l'extraction sont généralement de 24h et 100°C (Botta *et al.*, 2007, 2002; Brinton *et al.*, 1998; Ehrenfreund *et al.*, 2001; Glavin *et al.*, 2004, 1999, 2010, 2006; Martins *et al.*, 2007), mais peuvent varier. Certains auteurs extraient pendant 24h à 110°C (*e.g.*, Pizzarello and Cronin, 2000) ; ou pendant 20h à 100°C (*e.g.*, Meierhenrich *et al.*, 2004; Pizzarello *et al.*, 2004) ou 110°C (*e.g.*, Kvenvolden *et al.*, 1970).

b) 2^{ème} étape : hydrolyse acide

Après l'extraction, le surnageant, contenant la fraction de la matière organique soluble dans l'eau, est habituellement séparé en deux. Une partie est analysée directement, l'autre est soumise à une hydrolyse en présence d'acide chlorhydrique à 6 mol.L⁻¹ (6M).

L'analyse directe de l'extrait aqueux donne la composition en acides aminés libres (la fraction des acides aminés extractibles directement par extraction aqueuse). Il a été montré que les acides aminés libres sont extraits directement et ne comportent pas d'acides aminés synthétisés lors de l'extraction. Pour ce faire, un échantillon de Murchison a été extrait avec de l'eau deutérée (D₂O, oxyde de deutérium ou eau lourde) (Lawless et Peterson, 1975; dans Sephton, 2002). En plus des acides aminés libres, qui n'ont montré aucune incorporation de deutérium, seuls quelques acides aminés contenaient du deutérium, ce qui laissait présager

d'une production d'acides aminés à partir de précurseurs au cours de l'hydrolyse, et/ou d'échanges hydrogène – deutérium. Une étude postérieure a cependant conclu que toutes les liaisons carbone – deutérium présentes résultaient d'échanges hydrogène - deutérium dans des liaisons carbone – hydrogène déjà existantes (Pereira *et al.*, 1975; dans Sephton, 2002). Ainsi, les acides aminés libres sont bien des acides aminés extraits, et ne comportent pas d'acides aminés synthétisés pendant l'extraction.

L'analyse de l'extrait aqueux hydrolysé donne la composition totale en acides aminés (acides aminés libres plus acides aminés liés). Par définition, les acides aminés « liés » sont ceux qui ne sont détectés qu'après hydrolyse acide de l'extrait aqueux. En effet, l'analyse de l'extrait aqueux hydrolysé entraîne l'observation d'une augmentation de la concentration en acides aminés, comparativement à l'analyse directe des extraits aqueux. Le rendement peut être augmenté de plus de 100% entre l'extraction aqueuse et l'hydrolyse acide de l'extrait aqueux (Sephton, 2002). Par exemple, la glycine a été détectée dans des extraits des météorites Murchison et Murray à des concentrations de 3,4 et 1,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivement, alors que l'extrait hydrolysé contenait 6,1 et 3,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivement (Cronin et Moore, 1971; dans Sephton, 2002). L'hydrolyse acide d'extraits aqueux de météorites carbonées permet donc la détection des acides aminés liés, acides aminés qui n'étaient pas présents dans l'extrait aqueux simple.

Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer la nécessité d'une hydrolyse acide de l'extrait aqueux afin de détecter les acides aminés liés :

- Avant hydrolyse, les acides aminés liés ont leurs hydrogènes actifs chimiquement protégés et ne sont pas sujets à la fonctionnalisation et à l'analyse par CPG-SM (Glavin *et al.*, 2010).

- Avant hydrolyse, ils sont présents sous la forme de dérivés / précurseurs d'acides aminés, sensibles à l'hydrolyse acide – tels que des amides, nitriles ou lactames – et ces précurseurs de faible poids moléculaire sont convertis en acides aminés pendant l'hydrolyse (Burton *et al.*, 2012b; Glavin *et al.*, 2010).

Pour investiguer la nature de ces précurseurs, les composés sensibles à l'hydrolyse d'un extrait aqueux de Murchison ont été fractionnés par chromatographie d'échange cationique. 70% se sont comportés comme des composés neutres ou acides (Cronin, 1976; dans Sephton, 2002). Par la suite, ces composés ont été identifiés partiellement en tant qu'amides aliphatiques linéaires et cycliques, incluant des amides d'acides

monocarboxyliques, des monoamides d'acides dicarboxyliques, des amides d'hydroxyacides, des lactames, des carboxylactames, des lactimes, des acides aminés N-acétylés, et des hydantoïnes substituées (Cooper et Cronin, 1995; dans Sephton, 2002) (Figure I-27). Les carboxylactames, lactimes, acides aminés N-acétylés et hydantoïnes sont tous convertis en acides aminés au cours de l'hydrolyse, et peuvent donc être qualifiés de précurseurs (Sephton, 2002). Parmi les molécules basiques restantes, 9% pourraient être des peptides et des amino acyl amides (Cronin, 1976; dans Sephton, 2002). Des acides aminés liés peuvent également être formés par l'hydrolyse acide d'aminonitriles, selon la synthèse de Strecker (Hamilton and Nagy, 1972). Avant hydrolyse, les spectres de masse et temps de rétention de ces dérivés / précurseurs sont donc différents de ceux des acides aminés classiques, et ils ne sont donc pas détectés en tant que tels.

- Les acides aminés sont liés au sein d'un matériel de haut poids moléculaire, extrait par l'étape d'extraction aqueuse, qui libérera des acides aminés lors de l'hydrolyse acide (possiblement par le clivage de liaisons de type peptidique). Cette explication a été avancée pour expliquer l'augmentation plus importante (par rapport aux autres acides aminés) des quantités d'acide glutamique et d'acide aspartique après hydrolyse, en proposant qu'ils soient concentrés au sein de ce matériel (Cronin et Moore, 1971; Cronin, 1976a; dans Shock and Schulte, 1990).

- Moins probablement, les acides aminés liés sont piégés mécaniquement et sont libérés lors de l'hydrolyse acide par l'attaque et la dissolution d'une matrice qui les confinait (matrice extraite lors de l'extraction aqueuse) (Hamilton and Nagy, 1972).

La formation d'acides aminés au cours de l'hydrolyse a également été observée dans le cas de l'hydrolyse d'analogues de glaces interstellaires (Bernstein *et al.*, 2002).

Les fractions hydrolysée et non hydrolysée contiennent également de nombreux composés hydrosolubles, autres que les acides aminés, tels que des acides carboxyliques, des hydroxyacides, ainsi que divers cations et anions. Afin d'éviter les interférences causées par ces autres composés lors de la réaction de fonctionnalisation, les acides aminés sont généralement purifiés au préalable par chromatographie d'échange cationique. Pour ce faire, la solution contenant les acides aminés est passée à travers une résine d'échange cationique, qui est ensuite éluée avec de l'eau. Cette première élution à l'eau permet d'éliminer les molécules organiques non-cationiques et les anions métalliques, non retenues par la résine

d'échange cationique (les acides aminés, du fait de leurs groupements amines protonés et donc chargés positivement, étant retenus au sein de la colonne). L'élution des acides aminés est ensuite réalisée grâce à une solution de NH_4OH (*e.g.*, Cronin *et al.*, 1981 ; Cooper and Cronin, 1995). Eventuellement, les espèces éliminées lors de l'élution à l'eau, c'est-à-dire les molécules non-cationiques (tels que les acides carboxyliques et les hydroxyacides) et les anions métalliques, peuvent être récupérés puis fractionnés par chromatographie d'échange anionique (*e.g.*, Cooper and Cronin, 1995) (Burton *et al.*, 2012b) (Figure I-21).

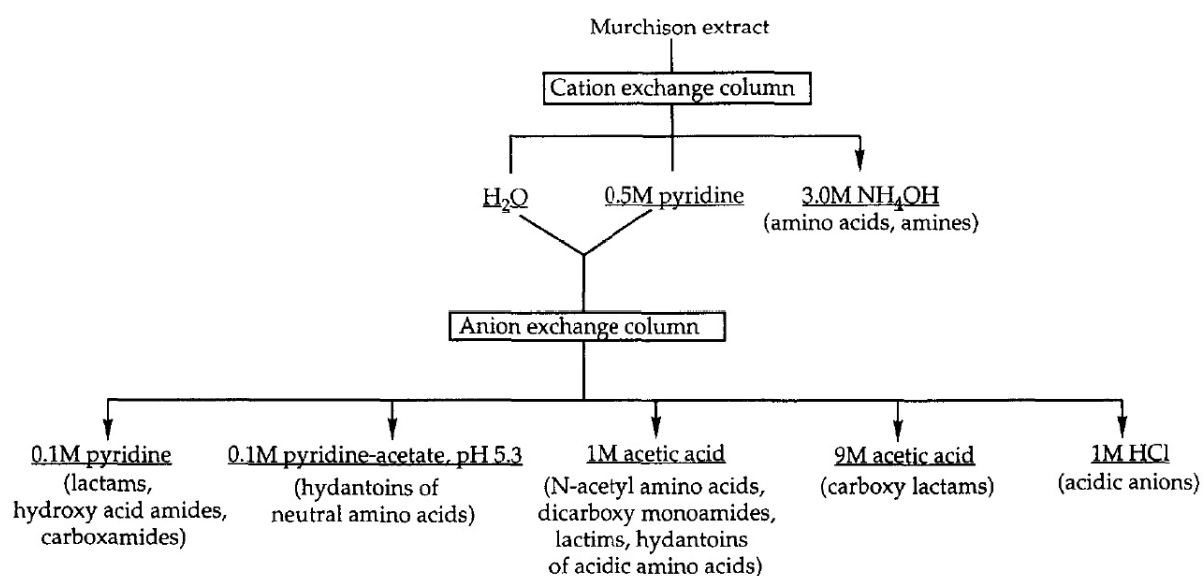


Figure I-27: Diagramme représentant le schéma de fractionnement par échange d'ions utilisé par Cooper et Cronin (1995) pour isoler les différents constituants d'un extrait aqueux de la météorite Murchison

L'hydrolyse acide peut être réalisée en phase liquide ou en phase vapeur. La procédure en phase liquide consiste en une hydrolyse dans du HCl liquide à 6M généralement pendant 24h à 100°C (*e.g.*, Brinton *et al.*, 1998; Glavin *et al.*, 1999; Pizzarello *et al.*, 2004), 105°C (*e.g.*, Nuevo *et al.*, 2008) ou 110°C (Cronin *et al.*, 1981; Cronin and Pizzarello, 1997; Fox *et al.*, 1970; Meierhenrich *et al.*, 2004; Muñoz Caro *et al.*, 2002; Nuevo *et al.*, 2007) ; ou pendant 20h à 100°C (*e.g.*, Kvenvolden *et al.*, 1970). L'hydrolyse peut être accomplie sous vide (*e.g.*, Fox *et al.*, 1970; Meierhenrich *et al.*, 2004; Muñoz Caro *et al.*, 2002; Nuevo *et al.*, 2007) ou atmosphère inerte (*e.g.*, Caro *et al.*, 2002; Glavin *et al.*, 2004). La procédure en phase gazeuse est réalisée à 150°C pendant 3h sous vide léger ou atmosphère inerte (*e.g.*, Botta *et al.*, 2007, 2002; Brinton *et al.*, 1998; Ehrenfreund *et al.*, 2001; Glavin *et al.*, 2004, 1999, 2010, 2006;

Martins *et al.*, 2007). L'extrait hydrolysé est ensuite généralement purifié, fonctionnalisé et analysé.

Les techniques d'analyse les plus utilisées sont généralement la chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection par fluorescence (« High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection », HPLC-FD) (*e.g.*, Botta *et al.*, 2007; Brinton *et al.*, 1998; Ehrenfreund *et al.*, 2001; Glavin *et al.*, 2004, 1999, 2010, 2006; Martins *et al.*, 2007) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (*e.g.*, Botta *et al.*, 2007; Caro *et al.*, 2002; Cooper and Cronin, 1995; Cronin *et al.*, 1981; Cronin and Pizzarello, 1997; Martins *et al.*, 2007; Meierhenrich *et al.*, 2004; Nuevo *et al.*, 2007; Pizzarello *et al.*, 2004; Pizzarello and Cooper, 2001; Pizzarello and Cronin, 2000).

1.4.1.4) Conclusion

Les différentes méthodes d'extraction des molécules organiques débutent par une étape de préparation d'échantillon souvent indispensable. Ceci est d'autant plus important que les molécules organiques recherchées dans les matrices extraterrestres sont à l'état de traces. Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes méthodes d'analyse qui permettent de détecter et quantifier des molécules organiques dans les météorites, milieux extraterrestres, et leurs analogues.

1.4.2) La méthode d'analyse

Dans le cadre de la recherche de molécules organiques dans des matrices d'origine extraterrestre, la chromatographie est une technique très utilisée. Le mot chromatographie provient du Grec « *chrōma* » (la couleur) et « *graphō* » (l'écriture). Elle signifie littéralement « écrire avec les couleurs ». Elle a été utilisée la première fois en 1903 pour séparer des pigments de plantes. Son principe repose sur la séparation d'un mélange de molécules entraîné par une phase mobile, en fonction de l'affinité de chaque molécule avec la phase stationnaire. Il existe différents types de chromatographie, en fonction de la nature de la phase mobile : chromatographie sur couche mince, chromatographie en phase gazeuse,

chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase liquide à haute performance, *etc.*

La chromatographie en phase gazeuse est largement utilisée lors de la recherche de molécules organiques *in situ*. Certaines des techniques d'extraction précédemment détaillées sont utilisées en amont de l'analyse, comme la pyrolyse, ou la thermochemolyse. Cependant, l'utilisation de solvants pour l'extraction peut présenter un risque de contamination si ces derniers ne sont pas éliminés ou totalement purs. La chromatographie est également largement utilisée au laboratoire pour l'analyse de météorites et d'analogues de sols martiens. Dans ce cadre, l'éventail de techniques utilisables est plus étendu.

1.4.2.1) Chromatographie échangeuse d'ions (IEC)

De nos jours, dans le cadre de l'analyse des météorites, l'utilisation de la chromatographie échangeuse d'ions (« Ion Exchange Chromatography », IEC) se fait principalement dans le but de purifier les acides aminés après hydrolyse et avant fonctionnalisation. Par le passé, couplée à une fonctionnalisation post-colonne, elle était largement utilisée en tant que technique d'analyse des acides aminés présents en quantités de l'ordre du ppb (Hamilton and Nagy, 1972). Les acides aminés sont des zwitterions qui incluent à la fois des groupements amine et carboxyle. Ainsi, au cours de l'échange de cations, plus la solution est acide, plus l'élution est rapide (les acides aminés sont plus à même d'avoir des charges négatives), et plus la solution est basique, plus l'élution est lente (les acides aminés sont plus à même d'avoir des charges positives). En IEC, puisque le réactif de fonctionnalisation utilisé réagit avec les fonctions amines, les amines simples sont également séparées. Cependant, la plupart des amines n'ont pas de groupe fonctionnel anionique (*e.g.* groupement carboxyle) comme les acides aminés, elles ont donc tendance à être éluées moins vite dans le cas de la chromatographie échangeuse de cations. On peut ainsi éviter l'interférence des amines lors de la quantification des acides aminés.

Les premières études sur du matériel extraterrestre (poussières lunaires et météorites) utilisaient la chromatographie d'échange d'ions. Grâce à cette technique, des acides aminés non protéiques et des hydrocarbures ont été détectés dans la météorite de Murchison (Cronin *et al.*, 1981; Kvenvolden *et al.*, 1970, 1971), et des acides aminés dans des échantillons lunaires (Fox *et al.*, 1970; Hare *et al.*, 1970).

1.4.2.2) Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM)

En dehors de la Terre, l'éventail de techniques analytiques est fortement limité par les contraintes liées à l'application spatiale : les instruments et techniques d'analyses utilisé(e)s doivent être miniaturisé(e)s, être relativement simples afin d'être automatisé(e)s, consommer de faibles quantités d'énergie, posséder une forte résistance mécanique, être fiables sous des conditions extrêmes de température et de pression présentes dans les environnements extraterrestres, et avoir une grande sensibilité (afin de pouvoir détecter des molécules organiques sous forme de traces, au sein de volumes d'échantillons réduits). La technique d'analyse doit également être capable de séparer et d'identifier des mélanges complexes de molécules organiques. La chromatographie, lorsqu'elle est couplée à une technique d'identification telle que la Spectrométrie de Masse (SM), est une technique remplissant tous ces critères.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Figure I-28) est actuellement une des rares techniques analytiques utilisée dans des environnements extraterrestres afin d'y rechercher des molécules organiques, et elle y est devenue la méthode de prédilection. Elle a déjà été prévue et utilisée pour différentes missions martiennes, comme Viking, MSL, ExoMars (Buch *et al.*, 2009, 2006; Oyama and Berdahl, 1977), ainsi que dans le cadre de l'exploration de Vénus (Gelman *et al.*, 1980) et Titan (Niemann *et al.*, 1997; Sternberg *et al.*, 1999) ; et est actuellement utilisée par la mission Rosetta (Goesmann *et al.*, 2015; Rosenbauer *et al.*, 1999; Szopa *et al.*, 2002, 2001). Elle est également couramment utilisée en laboratoire pour l'analyse des acides aminés dans les météorites et autres échantillons extraterrestres depuis le début des années 1970 (Kvenvolden *et al.*, 1970).

Le principe de la chromatographie en phase gazeuse est une séparation des molécules à partir d'un mélange complexe. Le mélange à analyser doit être volatilisé. Pour ce faire, il est injecté dans un injecteur (Figure I-28) dont la température est supérieure à la température d'ébullition des molécules à séparer. Ensuite, il est entraîné par la phase mobile, gazeuse dans le cas de la CPG (gaz vecteur neutre, par exemple azote, hélium) dans une colonne dont les parois sont recouvertes d'une phase stationnaire. Une réaction de fonctionnalisation peut être réalisée avant injection afin d'augmenter la volatilité des molécules cibles. La séparation

des constituants du mélange repose sur leur différente vitesse de migration au sein de la colonne, vitesse régie pour chaque molécule par ses interactions avec la phase stationnaire. Ce comportement dépend des propriétés physico-chimiques de la molécule, ainsi que des propriétés de la phase stationnaire et de la phase mobile, et donc des interactions entre la molécule et les phases stationnaires et mobiles. Chaque molécule possédant ainsi une vitesse de migration propre, elles sont éluées à des temps différents (le temps de rétention), ce qui permet une séparation temporelle des constituants du mélange, et leur identification lorsque les temps de rétentions sont connus. Cette technique permet la séparation et l'analyse qualitative et quantitative de composés à l'état de traces (par exemple des molécules organiques présentes dans des milieux extraterrestres). Il est également possible de réaliser une séparation énantiomérique.

Un détecteur est placé en sortie de colonne. En fonction du type de détecteur, ce dernier, en plus de permettre la détection et la quantification des espèces séparées, peut également aider à l'identification des composés élués. C'est notamment le cas du couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Figure I-28). Pour l'identification des solutés, la spectrométrie de masse (quadrapôle ou trappe d'ions) va ioniser les molécules par impact électronique, les fragmenter, et les séparer en fonction du rapport masse sur charge m/z . Chaque molécule se fragmente selon un schéma prédictible pour une même énergie d'ionisation (généralement 70 eV), fournissant un spectre de fragmentation typique, dont l'analyse permet l'identification de la molécule mère. Il est possible de vérifier l'identification d'un composé (basée sur son temps de rétention et son spectre de masse) par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse obtenus avec un standard ou une librairie.

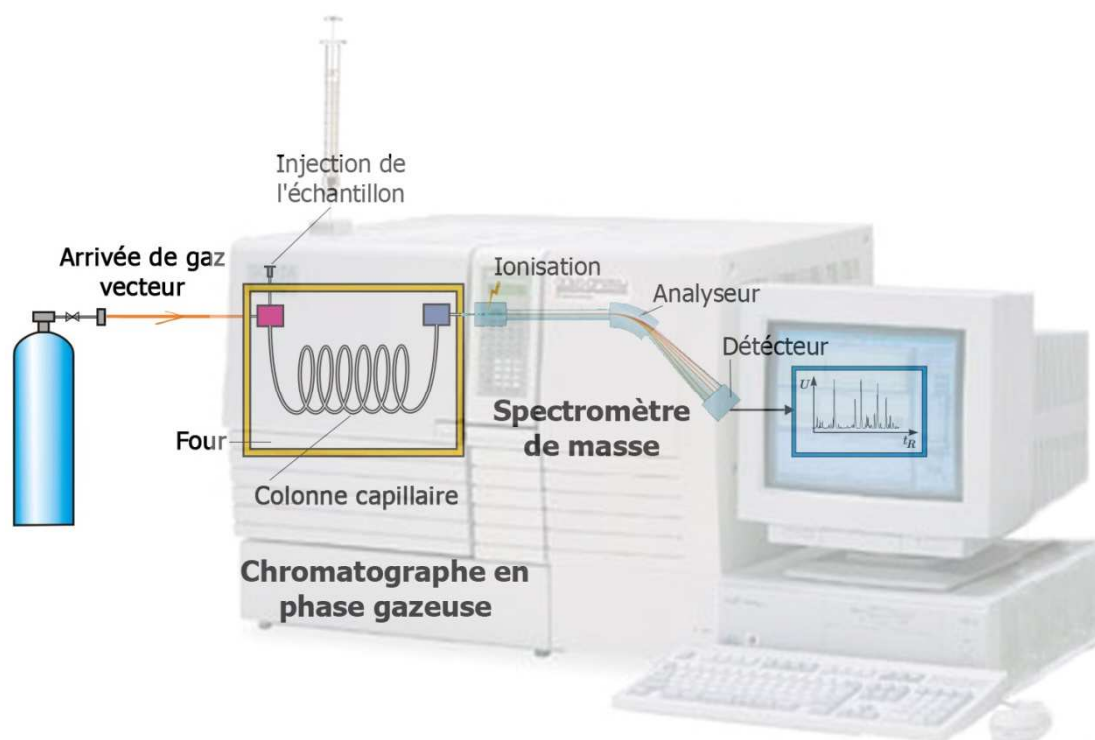


Figure I-28 : principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

1.4.2.3) Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (GC-IRMS)

L'analyse isotopique des acides aminés peut être réalisée grâce à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de rapport isotopique (« Gas Chromatography – Isotope Ratio Mass Spectrometry », GC-IRMS). Tout comme lors de la CPG-SM, dans cette technique, la CPG est utilisée pour séparer un mélange de molécules complexe, issu par exemple de l'extraction aqueuse d'une météorite. Lors de leur élution, les composés sont dirigés vers des réacteurs réalisant leur combustion et leur réduction (pour l'analyse du carbone et de l'azote) ou leur pyrolyse (pour l'analyse de l'hydrogène et de l'oxygène). Les gaz de CO_2 , N_2 , H_2 et CO sont alors analysés par un spectromètre de masse à secteur magnétique, et les ratios des isotopes stables sont calculés (Burton *et al.*, 2012b). Cette technique a été utilisée pour la mesure isotopique d'acides aminés dans des chondrites carbonées (*e.g.*, Engel and Macko, 1997, dans Burton *et al.*, 2012b). La mesure des ratios isotopiques permet de déterminer l'origine et la nature indigène des acides aminés météoritiques. En effet, les acides aminés extraterrestres sont enrichis en isotopes lourds, en comparaison avec les composés

terrestres, reflétant les environnements froids dans lesquels ces composés – ou leurs précurseurs – se sont formés (Burton *et al.*, 2012b).

Cette technique a permis de mettre en évidence l'origine extraterrestre de la glycine détectée dans du matériel cométaire rapporté par la mission Stardust (Elsila *et al.*, 2009; dans Burton *et al.*, 2012b), ainsi que des excès énantiomériques en faveur de la forme L de certains acides aminés météoritiques (Engel and Macko, 1997; dans Burton *et al.*, 2012b). Le couplage de la GC-IRMS avec un spectromètre de masse quadrupolaire permet d'identifier les composés, en plus de l'analyse isotopique, ce qui permet de réduire les incertitudes liées à la co-élution de composés, qui peut affecter les mesures énantiomériques et isotopiques (Elsila *et al.*, 2009; Pizzarello and Cronin, 1998; dans Burton *et al.*, 2012b).

Les ratios isotopiques permettent également de proposer des mécanismes de formation des acides aminés. Des analyses de ratios isotopiques du carbone d'acides aminés de la météorite Murchison ont permis de mettre en évidence des corrélations entre la structure des acides aminés, la longueur des chaînes, et les composition isotopiques. Ceci a permis de proposer une voie de formation des alpha-acides aminés grâce à la synthèse de Strecker (Pizzarello *et al.*, 2004; dans Burton *et al.*, 2012b).

1.4.2.4) Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance avec Détection par Fluorescence (HPLC-FD)

L'analyse des acides aminés météoritiques par chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection par fluorescence (« High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection », HPLC-FD) permet une nette amélioration de la sensibilité par rapport à la CPG-SM (environ d'un facteur 1000, *cf.* Burton *et al.*, 2012b). Cette technique s'avère utile du fait de la faible quantité d'échantillons disponibles, ainsi que dans le cadre de l'analyse de météorites moins riches en acides aminés, telles que les chondrites carbonées de type 1. L'HPLC-FD a été utilisée pour l'analyse d'acides aminés d'origine extraterrestre dans des sédiments de la limite Crétacé/Tertiaire (Zhao and Bada, 1989; dans Burton *et al.*, 2012b), ainsi que dans des sols lunaires (Brinton and Bada, 1996; dans Burton *et al.*, 2012b) et des micrométéorites carbonées de l'Antarctique (Brinton *et al.*, 1998; dans Burton *et al.*, 2012b). Cependant, la fluorescence n'est pas une technique d'analyse spécifique, c'est à dire qu'elle ne permet pas l'identification des acides aminés. Les

ratios énantiomériques peuvent seulement être déterminés grâce aux temps de rétention. Des composés co-éluant avec les acides aminés peuvent interférer et rendre difficile l'interprétation des chromatogrammes. Ces problèmes peuvent être en partie levés par couplage de l'HPLC avec un spectromètre de masse – tel qu'un spectromètre à temps de vol (« Time-of-Flight Mass Spectrometer », ToF-MS) (Glavin *et al.*, 2006; dans Burton *et al.*, 2012b). Les problèmes liés à la co-élution des composés sont ainsi évités, dans le cas où les composés co-élus possèdent des spectres de masse différents (Burton *et al.*, 2012b).

1.4.2.5) Conclusion

En exobiologie, la chromatographie a toujours été largement utilisée pour la recherche de molécules organiques au laboratoire et *in situ*, y compris en dehors de la Terre. Le tableau I-3 résume les différentes applications de cette technique :

Compound class ^a	Common biotic source ^b	Analytical detection method
Labile compounds to assess contemporary or recent life processes		
L-Amino acids/peptides	All life	GC, Py-GC
Sugars/polysaccharides	Flora (some fauna)	GC, GC-MS, GC-MS/MS
Nucleotides, bases, etc.	All life	Specific methods
Unsaturated lipid compounds	All life	GC, GC-MS
Biopolymers	All life	Py-GC-MS, specific methods
Lipid/bitumen compounds to assess biosynthesis in prior geological times		
Aliphatic hydrocarbons	Ubiquitous/not specific	GC, GC-MS, GC-IRMS
Aliphatic acids, alcohols	Ubiquitous/some specific	GC, GC-MS, GC-IRMS
Isoprenoids	Biogenic	GC, GC-MS, GC-IRMS
Steroids	Flora/fauna	GC-MS, GC-IRMS
Triterpenoids	Flora/microbes	GC-MS, GC-IRMS
Diterpenoids	Flora/microbes	GC-MS, GC-IRMS
Pigments	Flora/microbes	HPLC-MS, HPLC-IRMS
Biopolymers	Flora/microbes	Py-GC-MS
Novel and unknown biomarkers	–	GC-MS, Py-GC-MS, GC-IRMS
Abiogenic organic compounds		
D/L-Amino acids	Abiotic	GC, Py-GC
Aliphatic alcohols, acids, hydrocarbons	Abiotic	GC, GC-MS, GC-IRMS
PAH	Abiotic	GC, GC-MS, GC-IRMS

*Based on terrestrial life, assumed the same if extraterrestrial life is based on C/H/N/O/S chemistry.

^aLabile markers are stable for briefer geological periods after diagenetic preservation. Group 2 is stable for longer geologic periods.

^bSlash indicates that a distinction is possible (implies life on Earth).

GC, gas chromatography; Py, pyrolysis (flash heating); MS, mass spectrometry; IRMS, isotope ratio mass spectrometry; HPLC, high pressure liquid chromatography.

Tableau I-3 : Différents biomarqueurs / bioindices, leur origine et la méthode d'analyse utilisée pour la détection (tableau 1 dans Simoneit, 2002)

Cependant, au laboratoire (pour les météorites) et sur Mars, la plupart des bioindices, dont font partie les acides aminés, nécessitent une étape de fonctionnalisation, soit pour permettre leur détection, soit pour permettre leur séparation en CPG. En effet, la plupart des bioindices potentiellement détectables sur Mars et dans les météorites sont réfractaires (non volatiles). C'est en particulier le cas des acides aminés. Nous allons donc nous intéresser aux diverses techniques de fonctionnalisation, avec un focus sur les acides aminés météoritiques et sur la fonctionnalisation au MTBSTFA, qui est en particulier utilisée pour la détection d'acides aminés potentiels sur Mars.

1.4.3) La fonctionnalisation

La fonctionnalisation est largement répandue dans le cadre de l'exobiologie. Par exemple, lors l'analyse des molécules organiques dans les météorites (principalement les acides aminés), les premières techniques de fonctionnalisation utilisées – inspirées des techniques d'analyse utilisées dans d'autres domaines tels que la recherche médicale, pharmacologique, biologique, alimentaire ou agronomique – consistaient en une fonctionnalisation post-colonne chromatographique, permettant la détection des molécules. La fonctionnalisation pré-colonne, quant à elle, permet de volatiliser les molécules organiques réfractaires, afin de pouvoir les séparer par CPG. Cette dernière est largement utilisée de nos jours dans le cadre de l'exobiologie *in situ* et au laboratoire.

Selon la « Royal Society of Chemistry », la fonctionnalisation est « la transformation d'un composé chimique (le réactif) en un autre composé similaire (le dérivé, ou dérivatif), par altération d'un ou plusieurs de ses groupes fonctionnels. La fonctionnalisation est généralement réalisée pour altérer la réactivité ou changer une propriété physique telle que la solubilité, le point d'ébullition, le point de fusion, la stabilité thermique, *etc.* »

1.4.3.1) Fonctionnalisation post-colonne

La fonctionnalisation post-colonne consiste à séparer les composés à analyser au sein d'une colonne chromatographique par échange d'ions (chromatographie échangeuse de cations pour les acides aminés), puis à les faire réagir avec le réactif de fonctionnalisation en sortie de colonne, avant leur détection. Cette méthode peut être automatisée. Puisque les analytes sont séparés avant la réaction de fonctionnalisation, l'efficacité de la réaction est peu affectée par la matrice. En revanche, elle entraîne une grande consommation de réactif de fonctionnalisation. De plus, l'apport constant de réactif de fonctionnalisation limite la panoplie de réactifs qui peuvent être utilisés. En effet, le réactif en excès ne doit pas perturber la détection.

La fonctionnalisation post-colonne à la ninhydrine, précédée par une séparation des acides aminés par échange cationique (« Ion Exchange Column », IEC), a été proposée en 1958 (Moore *et al.*, 1958; Spackman *et al.*, 1958). La détection se fait par spectroscopie d'absorption dans le visible (colorimétrie). Cette technique permet un grand degré de spécificité, du fait du nombre réduit de composés qui réagissent avec la ninhydrine (Hamilton and Nagy, 1972). La méthode à la ninhydrine est restée toutefois la plus utilisée pour l'analyse des protéines pendant une vingtaine d'années. Puis d'autres réactifs de fonctionnalisation post-colonne ont été utilisés, par exemple la fluorescamine et l'o-phthalaldehyde (OPA), indispensables pour la détection des acides aminés par spectroscopie de fluorescence.

Les réactifs utilisés pour la fonctionnalisation post-colonne dans le cadre de l'analyse d'acides aminés météoritiques sont la ninhydrine et l'o-phthalaldehyde (OPA). L'IEC couplée à la fonctionnalisation post-colonne par ninhydrine a par exemple été utilisée pour l'analyse d'acides aminés dans des poussières lunaires (Fox *et al.*, 1970; Hare *et al.*, 1970), et, plus récemment, d'acides aminés produits lors de l'irradiation UV d'analogues de glaces interstellaires (Nuevo *et al.*, 2008). L'IEC couplée à la fonctionnalisation post-colonne par OPA a par exemple été utilisée pour l'analyse d'acides aminés de la météorite Murchison (Cronin *et al.*, 1981).

1.4.3.2) Fonctionnalisation pré-colonne

a) Introduction

Lors de la fonctionnalisation pré-colonne, les molécules organiques sont fonctionnalisées avant l'injection, et les produits de la réaction de fonctionnalisation sont alors séparés et détectés. Cette technique présente certains avantages. Par exemple, la réaction de fonctionnalisation peut se faire dans un réacteur (le réactif de fonctionnalisation ne doit donc pas être ajouté de manière continue). Ainsi, la consommation de réactif est moindre comparée à la fonctionnalisation post-colonne. De plus, même si le réactif de fonctionnalisation est en excès, sa détection ne pose pas de problème tant qu'il est bien élué séparément des analytes. En outre, la diversité de réactifs de fonctionnalisation permet la sélection du réactif le plus adapté au type de détection (*e.g.* UV, VIS, RF). Enfin, elle permet d'analyser des molécules hydrophiles par HPLC en phase inverse, grâce à l'ajout de groupements hydrophobes sur les molécules cibles.

Cependant, puisque l'agent de fonctionnalisation est ajouté directement à l'échantillon, le rendement de la réaction peut être affecté s'il existe des interférences avec la matrice (*e.g.* par interférence entre le réactif et des espèces présentes dans l'échantillon). De plus, les produits de la réaction de fonctionnalisation peuvent être instables, ce qui peut affecter la quantification.

Les procédures de fonctionnalisation varient fortement, pouvant se faire à température ambiante, ou nécessiter un chauffage, ou encore nécessiter une purification post-réaction. L'HPLC en phase inverse peut parfois être nécessaire pour séparer les produits de la réaction de fonctionnalisation.

Des exemples de réactifs de fonctionnalisation utilisés pour l'analyse d'acides aminés (tous domaines confondus) sont l'OPA, le phenyl isothiocyanate (PITC) (utilisé dans la technique décrite par Heinrikson and Meredith, 1984; et commercialisée sous le nom de la méthode Pico-Tag par la société Waters), et le chlorure de dansyle (Bidlingmeyer *et al.*, 1984).

b) Réactifs utilisés en HPLC-FD

Dans le cadre de l'analyse d'acides aminés météoritiques, la technique de la chromatographie en phase liquide à haute performance avec détections par fluorescence (HPLC-FD) est largement utilisée. Dans cette technique le réactif de fonctionnalisation généralement utilisé est l'OPA avec la *N*-acetyl-L-cystéine (NAC). Ils réagissent avec les amines primaires. En théorie, il devrait être possible de séparer les énantiomères d'acides aminés en

utilisant une phase stationnaire chirale. Cependant, la séparation de mélanges d'acides aminés météoritiques par chromatographie liquide avec une colonne chirale n'a pas encore été réalisée de manière satisfaisante (Burton *et al.*, 2012b). La technique à l'OPA/NAC permet une séparation énantiomérique plus performante grâce à la formation de diastéréoisomères (la NAC est chirale), et la détection se fait par fluorescence. Cette technique a par exemple permis l'analyse d'acides aminés dans des météorites (CM2), des micrométéorites prélevées en Antarctique (Brinton *et al.*, 1998; Glavin *et al.*, 2004, 2006), des sols lunaires (Brinton and Bada, 1996), ainsi que dans la météorite martienne ALH84001 (Bada *et al.*, 1998), et dans des chondrites carbonées (CI, CR et CM) (Glavin *et al.*, 2010).

Cependant, nous nous intéresserons plus particulièrement à la chromatographie en phase gazeuse.

c) Réactifs utilisés en CPG

Dans cette technique (tous domaines confondus), la volatilité et la stabilité thermique des molécules présentes dans un échantillon est cruciale. Si un composé ne possède pas les caractéristiques adéquates, l'analyse peut se révéler improductive.

Les composés organiques polaires qui contiennent des atomes d'hydrogène labiles (par exemple au sein de groupes hydroxyle, amino et thiol) possèdent typiquement une faible volatilité due à leur tendance à s'associer entre eux ou à s'associer avec des liquides polaires ou des matrices solides, à travers la formation de liaisons hydrogènes (Knapp, 1979).

Dans le cadre de la CPG, la fonctionnalisation a pour objectifs principaux :

- de modifier les composés dans le but de les rendre suffisamment volatils pour qu'ils puissent être séparés sur une colonne chromatographique (Botta and Bada, 2002),
- d'améliorer la résolution et de réduire le « tailing » des composés polaires,
- d'améliorer l'efficacité de l'analyse et de favoriser la détection et la stabilité des composés.

Le choix d'un réactif de fonctionnalisation est fonction du groupe fonctionnel visé, la présence d'autres groupes fonctionnels dans la molécule, et l'objectif de la fonctionnalisation.

De plus, certains critères influencent le choix d'un réactif de fonctionnalisation :

- le rendement de la fonctionnalisation doit être le plus élevé possible ;

- le réactif ne doit pas causer de réarrangements ou d'altérations structurales pendant la formation du dérivatif ;
- le réactif ne doit contribuer à la perte d'échantillon pendant la réaction,
- le dérivatif doit être stable.

Trois types de réactions sont utilisées en tant que fonctionnalisation en CPG (dans tous les cas, ce sont les hydrogènes actifs, ou acides, des molécules organiques qui sont remplacés par le groupement souhaité) :

- l'alkylation, qui consiste en le transfert d'un groupement alkyle (*e.g.* méthyle, éthyle, propyle, *etc.*) du réactif de fonctionnalisation vers la molécule cible.
- l'acylation, qui consiste en l'addition d'un groupement acyle RCO- (par exemple, l'acétylation, également appelée éthanoylation). L'acylation d'une amine donnera un amide, et celle d'un alcool donnera un ester.
- la silylation, qui consiste en l'addition d'un groupement alkylsilyle (par exemple un groupement triméthylsilyle (TMS), $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

Nous allons ici plus particulièrement nous intéresser aux méthodes de fonctionnalisation habituellement utilisées dans le cadre de l'analyse des acides aminés météoritiques et dans le cadre de la recherche de bioindices dans les milieux extraterrestres. Pour cette dernière, nous allons nous pencher sur les réactifs utilisés lors de missions actuelles ou futures, c'est-à-dire le DMF-DMA, TMAH et MTBSFTA.

TFAA/Isopropanol et autres agents d'acylation/estérification

Dans le cadre de l'analyse des acides aminés météoritiques par CPG-SM, la fonctionnalisation consiste généralement en une estérification du groupement acide carboxylique, plus une acylation de l'amine (N-acylation) ; ce qui permet d'augmenter la volatilité des acides aminés. L'estérification se fait grâce à un alcool, comme l'isopropanol. La N-acylation se fait grâce à un agent acylateur, comme l'anhydride trifluoroacétique (« TriFluoroAcetic Anhydride », TFAA), qui permet d'ajouter un groupement trifluoroacetyl à l'amine. Les produits obtenus dans ce cas sont donc des N-trifluoroacetyl-isopropyl esters. Le TFAA peut être remplacé par l'anhydride pentafluoropropionique (« PentaFluoroPropionic Anhydride », PFPA), permettant la formation de N-pentafluoropropionyl isopropyl esters.

Ces deux techniques combinées (TFAA / isopropanol et PFPA / isopropanol) ont été utilisées pour l'analyse d'acides aminés dans les météorites Murray et Murchison (l'agent de fonctionnalisation – l'isopropanol – est achiral, et la séparation des énantiomères a été obtenue sur des colonnes chirales) (Cronin and Pizzarello, 1997; Pizzarello and Cooper, 2001; Pizzarello and Cronin, 2000). La fonctionnalisation au TFAA / isopropanol a été utilisée pour l'analyse d'acides aminés dans des chondrites CR de l'Antarctique (Martins *et al.*, 2007). Botta *et al.* (2007) ont réalisé une fonctionnalisation par acide pentafluoropropionique (PFP) / isopropanol pour l'analyse d'acides aminés dans des météorites CM1 tombées en Antarctique. D'autres types de fonctionnalisations peuvent être utilisées, telle que la formation de *N,N'*-diethoxycarbonyl ethyl esters d'acides aminés (dérivatifs ECEE). Cette technique de fonctionnalisation a permis l'analyse d'acides aminés dans la météorite de Murchison (Meierhenrich *et al.*, 2004) ainsi que dans des analogues de glaces interstellaires irradiées (Muñoz Caro *et al.*, 2002).

Exemple d'application : la séparation des énantiomères

La séparation des énantiomères peut se faire de deux manières différentes :

- Grâce à leur conversion en diastéréoisomères. En effet, contrairement aux énantiomères, les diastéréoisomères ne possèdent pas les mêmes propriétés physiques (*e.g.*, point d'ébullition, point de fusion, solubilité). Ils peuvent donc être séparés par des moyens conventionnels, comme la cristallisation ou la chromatographie achirale. Par exemple, la S-Brucine (un alcaloïde, possédant un groupement amine) peut être utilisée pour former deux diastéréoisomères à partir des deux énantiomères (R et S) d'un acide carboxylique. On aura donc un diastéréoisomère R, S et un diastéréoisomère S, S, qui peuvent alors être séparés. Dans le cadre de l'analyse des acides aminés chiraux météoritiques par CPG-SM, la fonctionnalisation se fait par la formation de diastéréoisomères, généralement grâce à une estérification du groupement carboxyle avec un alcool chiral, plus une N-acylation (par le TFAA par exemple). La fonctionnalisation pré-colonne par l'emploi de TFAA et (+)-2-pentanol a ainsi été utilisée pour l'analyse d'acides aminés dans la météorite Murchison (Cronin *et al.*, 1981). Kvenvolden *et al.* (1971) ont utilisé le D-2-pentanol / TFAA (permettant la formation d'esters de *N*-trifluoroacetyl-D-2-butyle), pour l'analyse d'acides aminés dans cette même météorite.

- Par chromatographie chirale. Dans cette technique, la phase stationnaire de la colonne chromatographique est chirale. Un des deux énantiomères aura donc plus d'affinités avec la phase stationnaire que l'autre, son temps de rétention en sera alors augmenté, permettant la séparation des énantiomères. L'emploi d'un réactif de fonctionnalisation chirale n'est alors pas forcément nécessaire. Par exemple, l'emploi de colonnes chromatographiques chirales (telles que la Chirasil-L-Val, Chirasil-D-Val, ou Chirasil-Dex CB) ont permis la séparation d'énantiomères des météorites Murchison et Murray (la fonctionnalisation est faite par TFAA / isopropanol) (Cronin and Pizzarello, 1997; Pizzarello and Cooper, 2001; Pizzarello and Cronin, 2000) ainsi que de chondrites CR de l'Antarctique (Martins *et al.*, 2007).

N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA)

Le DMF-DMA est un agent de fonctionnalisation achiral, qui permet de conserver les centres chiraux (C*) des molécules. Les dérivés sont ensuite séparés sur une colonne chromatographique chirale. Lors de la réaction avec un acide aminé, le H labile du groupement acide carboxylique est remplacé par un groupement méthyle, et l'amine est remplacée par une aldimine secondaire (R'-NH₂ devient R'-N=CHN(CH₃)₂, R' représentant le groupement –CHR(COOCH₃)). L'acide aminé réagit donc avec le DMF-DMA pour former un amidine ester (Figure I-29).

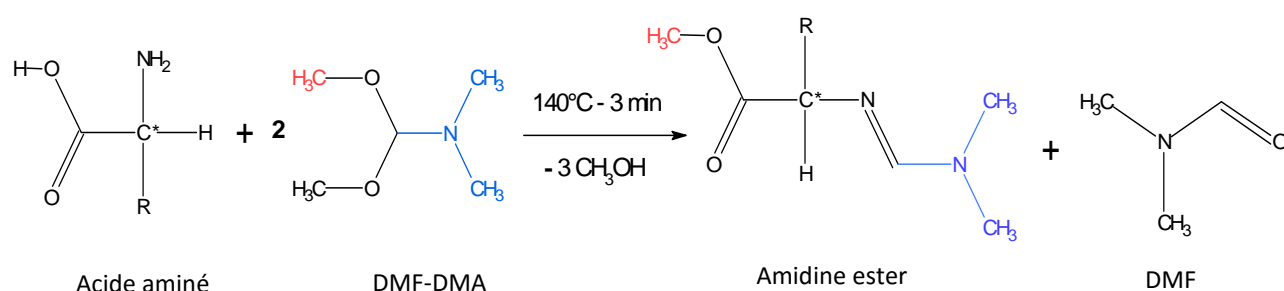


Figure I-29 : schéma de la fonctionnalisation d'un acide aminé au DMF-DMA.

Le DMF-DMA présente les avantages de la production de dérivatifs de faible poids moléculaire et d'une grande résistance aux conditions spatiales. La réaction de fonctionnalisation est simple, rapide, et facilement automatisable. Ce réactif permet la

séparation énantiomérique tout en permettant l'analyse par CPG-SM grâce à la réduction de la volatilité des acides aminés fonctionnalisés. Freissinet *et al.* (2010) ont montré que le chauffage à 140°C pendant 3 minutes représentait des conditions optimales pour la fonctionnalisation des acides aminés. Ces conditions ont permis d'identifier 19 des 20 acides aminés du vivant et de séparer les énantiomères de 10 de ces acides aminés (sans compter la glycine qui est achirale), tout en minimisant la racémisation. Cependant, le DMF-DMA peut réagir avec des molécules d'eau présentes dans l'échantillon.

La fonctionnalisation au DMF-DMA est embarquée dans l'instrument COSAC de la mission Rosetta de l'ESA sur la comète 67P/Churyumov-Gerasimenko (Goesmann *et al.*, 2005). Elle est également prévue pour l'instrument MOMA (mission ExoMars 2018).

Tetramethylammonium (TMAH)

Le TMAH est utilisé dans le cadre de la thermochemolyse (pyrolyse en présence d'un réactif de fonctionnalisation, *cf.* paragraphe 1.4.1.2.c) et permet de réaliser une méthylation des groupements possédant des liaisons polaires, permettant l'analyse par CPG de composés polaires (Figure I-30). Les cibles de cette technique sont les composants moléculaires polaires contenus dans des molécules plus complexes. Elle est utilisée par l'instrument SAM sur MSL et sera également embarquée sur l'expérience MOMA.

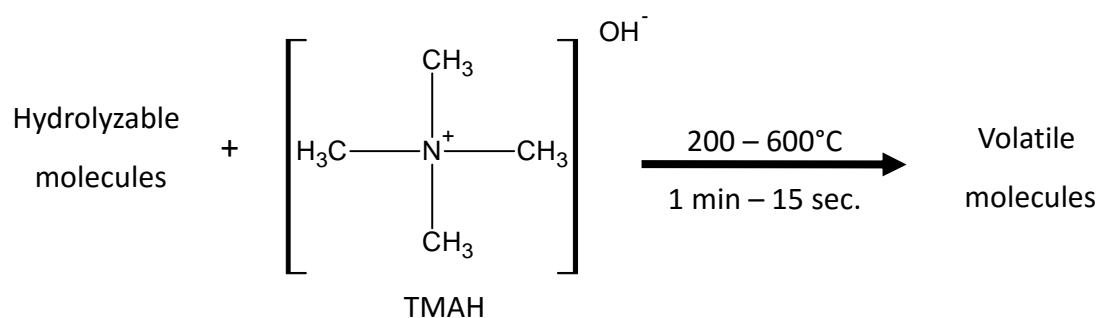


Figure I-30 : schéma de la réaction de thermochemolyse

N-méthyl-N-tert-butyltriméthylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA)

La silylation est la méthode de fonctionnalisation la plus utilisée. Presque tous les groupes fonctionnels polaires (hydroxyle, acide carboxylique, amine, thiol, phosphate) peuvent être fonctionnalisés par les réactifs de silylation. Dans le cas de la silylation, le remplacement d'un hydrogène actif par un groupement silyl réduit la polarité du composé et donc l'intensité des liaisons hydrogènes. Le dérivatif silylé est donc moins polaire, plus volatil, et plus stable thermiquement. En général, l'avantage des réactions de silylation par rapport à d'autres méthodes de fonctionnalisations est qu'elles s'effectue en une seule étape qui ne requiert pas la séparation des dérivatifs avant l'analyse par CPG (Knapp, 1979).

Plusieurs groupements silyle sont utilisés, dont le groupement triméthylsilyle (TMS), $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, qui est le plus populaire et versatile ; ou le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (tBDMS). Le réactif utilisé pour l'ajout des groupements tBDMS est le *N*-méthyl-*N*-*tert*-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA). Le MTBSTFA est moins sensible à l'hydrolyse que d'autres réactifs utilisés pour la silylation.

Les rendements typiques obtenus avec ce réactif sont supérieurs à 96% (Mawhinney and Madson, 1982). Le MTBSTFA est utilisé notamment par SAM (première fonctionnalisation dans un environnement extraterrestre) et sera utilisé par MOMA (Figures I-31, I-32). Il a également permis de mettre en évidence des acides aminés et acides carboxyliques dans un échantillon de sol d'Atacama (Buch *et al.*, 2009).

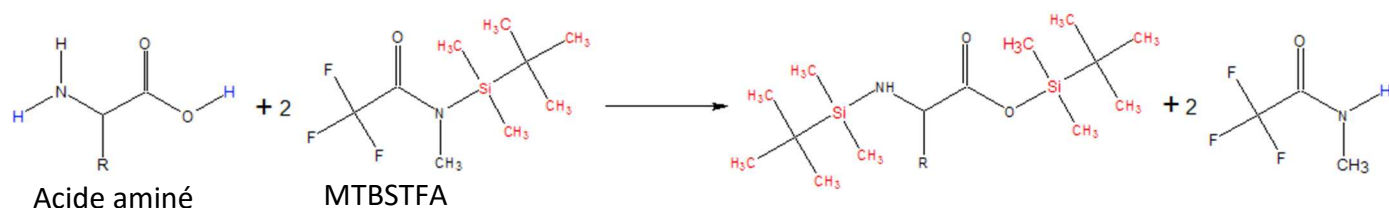


Figure I-31 : Schéma de la fonctionnalisation d'un acide aminé au MTBSTFA

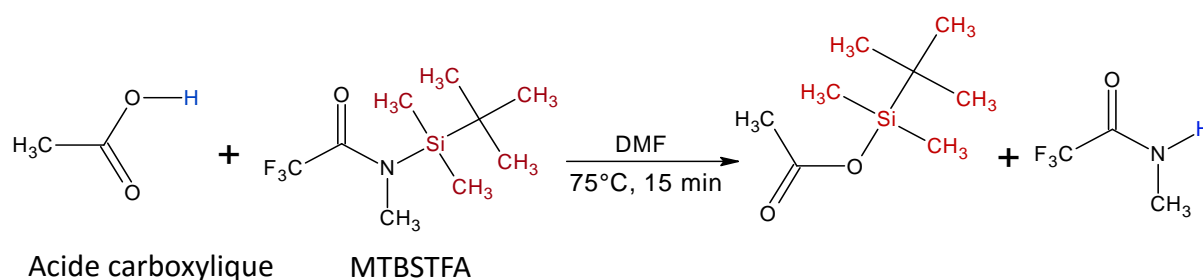


Figure I-32 : Schéma de la fonctionnalisation d'un acide carboxylique au MTBSTFA

1.4.3.3) Conclusion

Les techniques de fonctionnalisation utilisées dans le cadre de la recherche de molécules organiques dans les matrices extraterrestres ont connu une évolution au cours du temps. Dans l'espace, différents agents de fonctionnalisation sont utilisés en fonction du type d'analyse ou de molécules ciblées. Le MTBSTFA, le plus versatile, permet une fonctionnalisation d'un grand nombre de composés organiques réfractaires (dont les acides aminés) afin de pouvoir les analyser par CPG-SM.

1.4.4) Conclusion

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique alliant simplicité et sensibilité, ce qui lui vaut d'être utilisée dans de nombreuses missions spatiales (par exemple Rosetta), dont les missions martiennes récentes et futures (MSL et ExoMars). Cependant, les bioindices recherchés lors de ces expériences sont des molécules réfractaires. Une étape de fonctionnalisation chimique est donc nécessaire en amont de la séparation chromatographique, afin de rendre les molécules cibles plus volatiles. Dans ce cadre, nous allons nous intéresser au MTBSTFA, qui est utilisé par les instruments SAM de la mission MSL et sera utilisé par l'instrument MOMA de la mission ExoMars 2018.

La chromatographie est également utilisée en laboratoire afin de rechercher les mêmes bioindices au sein des météorites. Une étape d'hydrolyse acide est alors réalisée sur un extrait à l'eau d'échantillons de météorites. L'objectif est de libérer et/ou générer des acides aminés. La technique de référence a longtemps été celle de l'hydrolyse en phase liquide, c'est donc à celle-ci que nous allons nous intéresser.

Cependant, ces étapes ne sont pas sans biais : le rendement de fonctionnalisation peut être altéré par la minéralogie de la matrice (ainsi que par des sels lors du protocole d'hydrolyse acide), et l'hydrolyse acide peut entraîner des pertes en acides aminés libres.

La partie qui va suivre contient premièrement une bibliographie concernant l'impact de l'hydrolyse sur la récupération des acides aminés. Deuxièmement, plusieurs types de minéralogies martiennes – parmi celles qui ont été identifiées sur Mars (*cf.* paragraphe 1.3.6.3) — seront choisies, afin de tester leur influence sur le rendement de la fonctionnalisation d'acides aminés.

1.5) Problèmes liés aux protocoles d'extraction et de fonctionnalisation

1.5.1) Impact de l'hydrolyse acide en phase liquide sur la récupération des acides aminés

1.5.1.1) Introduction

L'utilisation de l'hydrolyse acide sur des extraits aqueux de météorites a été inspirée par celle réalisée lors de l'analyse des acides aminés protéiques. Ainsi, les désavantages de cette technique, notamment les pertes d'acides aminés durant l'hydrolyse acide en phase liquide, sont déjà documentés.

Lors de l'hydrolyse des protéines, afin d'en analyser les acides aminés constitutifs, il existe un compromis entre la dégradation des acides aminés fragiles et l'obtention des acides aminés difficilement libérés. Cette difficulté peut être due à la résistance au clivage de certaines liaisons peptidiques, en fonction de l'agent hydrolytique utilisé, et du manque d'accessibilité à la liaison peptidique. Cette dernière peut être due à (i) l'encombrement stérique causé par les chaînes latérales volumineuses des acides aminés aliphatiques (comme c'est le cas pour la valine, la leucine, l'alanine, l'isoleucine et le tryptophane; (Light and Smith, 1963; Roach and Gehrke, 1970) et (ii) à la structure macromoléculaire de la protéine (structure

secondaire et tertiaire, qui limite le dépliement de la protéine, *i.e.* certaines régions de la protéine peuvent être hydrolysées plus rapidement que d'autres) (Light and Smith, 1963; Roach and Gehrke, 1970). Par exemple, la récupération des acides aminés dans des chaînes peptidiques hydrophobes est faible, et certaines liaisons peptidiques sont résistantes à l'hydrolyse au HCl (*e.g.* Val-Val, Val-Ile et Ile-Val ; Tsugita *et al.*, 1987).

Des temps d'hydrolyse plus longs permettront donc d'obtenir la quantité totale des acides aminés difficilement libérés, mais entraîneront une dégradation des acides aminés labiles. Inversement, un temps d'hydrolyse court limitera la dégradation des acides aminés labiles, mais la totalité des acides aminés difficilement relâchés ne sera pas obtenue. Ceci est illustré par la figure I-33, sur laquelle on voit une dégradation de la sérine avec l'augmentation du temps d'hydrolyse. Quelques études se sont donc intéressées au recouvrement (c'est-à-dire l'inverse du degré de destruction) des acides aminés fragiles lors de l'hydrolyse d'une protéine.

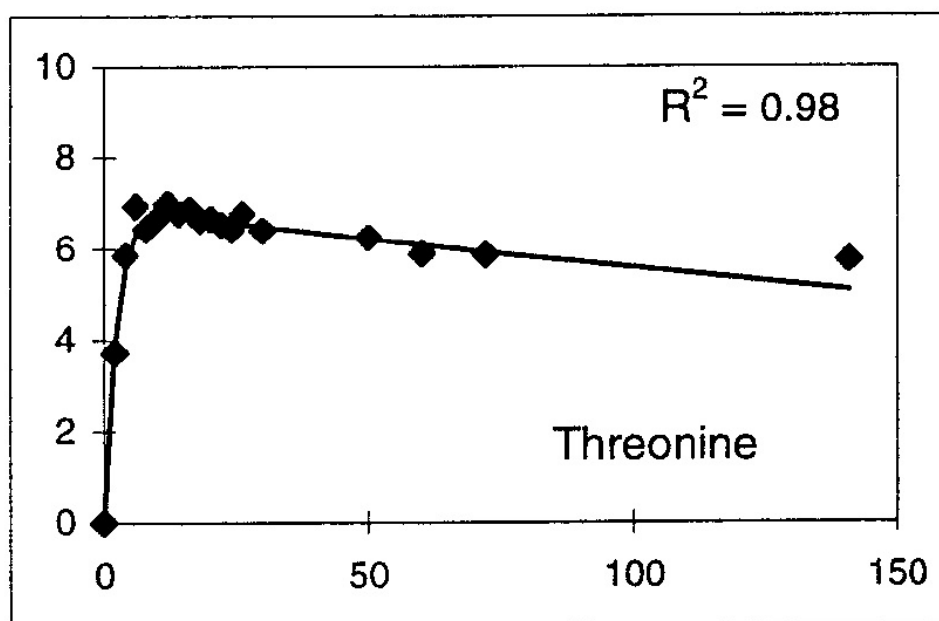


Figure I-33 : Effet du temps d'hydrolyse (axe des abscisses, en heures) sur l'obtention de la thréonine (axe des ordonnées, en moles de thréonine par mole de protéine) au cours de l'analyse des acides aminés du lysozyme de blanc d'œuf (chaque point représente la valeur moyenne de deux réplicats) (source: Darragh *et al.*, 1996)

1.5.1.2) La dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse acide

a) Le tryptophane et la cystéine

Le tryptophane est connu pour être nettement labile au cours de l'hydrolyse (Snell, 1957, dans Keil and Kirchman, 1991; Moore and Stein, 1963). Sa destruction est conséquente (Light and Smith, 1963), au point d'être presque complète (Roach and Gehrke, 1970) voire complète (Keil and Kirchman, 1991; Rees, 1946; Tsugita *et al.*, 1987) (des méthodes spéciales sont nécessaires pour la détermination de cet acide aminé, *cf.* Ozols, 1990). Une perte considérable de cystéine peut également se produire (Roach and Gehrke, 1970), bien qu'à un degré moindre (Light and Smith, 1963). Elle ne peut pas non plus être déterminée directement à partir des échantillons hydrolysés (Fountoulakis and Lahm, 1998).

La quantification du tryptophane peut être réalisée grâce à l'hydrolyse en présence de différents agents protecteurs du tryptophane, tels que l'acide thioglycolique (Yano *et al.*, 1990, dans Andersen, 1994), le dodecanethiol (West et Crabb, 1992, dans Andersen, 1994), le mercaptoethanol (Ng *et al.*, 1987, dans Fountoulakis and Lahm, 1998), le phénol (Muramoto *et al.*, 1990, dans Fountoulakis and Lahm, 1998), et la tryptamine (3-[2-aminoethyl]indole) (Molnar-Perl *et al.*, 1993, dans Fountoulakis and Lahm, 1998). Une hydrolyse à l'acide mercaptoethanesulfonique (Penke *et al.*, 1974, dans Ozols, 1990) ou methanesulfonique (Simpson *et al.*, 1975, dans Ozols, 1990) ou une hydrolyse alcaline (Hugli et Moore, 1972, dans Ozols, 1990) peuvent également être réalisées.

La cystéine ne peut pas être analysée directement après hydrolyse acide, et doit donc être, avant l'hydrolyse, oxydée à l'acide performique (Hirs, 1990, dans Ozols, 1990) ; ou bien réduite (à l'aide d'un thiol, comme le dithiothreitol ou le 2-mercaptoethanol) puis S-carboxyméthylée (S-carboxyméthylation à l'aide d'acide iodoacétique) (Hirs, 1990, dans Ozols, 1990), ou S-pyridyléthylée (S-pyridylethylation à l'aide de 4-vinylpyridine) (Raferty et Cole, 1966, dans Ozols, 1990). L'acide iodoacétique et la 4-vinylpyridine sont référées en tant qu'agents d'alkylation de la cystéine. Un protocole pour la S-carboxyméthylation / S-pyridylethylation est donné dans Ozols (1990).

L'oxydation à l'acide performique entraîne la conversion de la cystéine et de la cystine en acide cystéique. L'acide cystéique est un dérivatif stable lors de l'hydrolyse acide selon Ozols (1990). Cependant, il a été montré que l'acide cystéique est également dégradé lors de l'hydrolyse (Darragh *et al.*, 1996). L'oxydation à l'acide performique entraîne également la destruction de la tyrosine et du tryptophane.

Cependant, ces méthodes de fonctionnalisation / conversion pré-hydrolyse présentent un intérêt seulement dans le cas où les acides aminés sont déjà présents à l'état libre avant l'hydrolyse. Or, une grande partie des acides aminés dans les météorites sont formés au cours de l'hydrolyse de l'extrait aqueux. L'intérêt de protéger des acides aminés pour lesquels la plus grande quantité n'est pas encore formée est donc limité. De plus, la cystéine n'a jamais été détectée dans des météorites.

Alternativement, la cystéine peut être quantifiée grâce à l'hydrolyse en présence de réactifs particulier. Par exemple, l'ajout de sodium azide (0.2%) dans le HCl 6M (Manneberg *et al.*, 1995, dans Fountoulakis and Lahm, 1998). Cependant, ceci entraîne une oxydation partielle de la méthionine en méthionine sulfone (pour la méthionine, l'analyse doit donc être réalisée avec et sans ajout d'azide). Le recouvrement des autres acides aminés n'est pas affecté (Fountoulakis and Lahm, 1998). Dans le but de quantifier la cystéine, l'hydrolyse peut également être réalisée en présence d'acide 3,3'-dithiodipropionique (Barkholt and Jensen, 1989), d'acide dithiodiglycolique (Hoogerheide et Campbell, 1992, dans Fountoulakis and Lahm, 1998) ou d'acide thioglycolique (Sottrup-Jensen, 1993, dans Fountoulakis and Lahm, 1998).

Il existe également, pour quantifier la cystéine, des méthodes d'hydrolyse avec d'autres acides, comme l'acide méthanesulfonique ou l'acide mercaptoéthanesulfonique (Fountoulakis and Lahm, 1998).

Cependant, si l'hydrolyse a été réalisée en présence de mercaptoéthanol ou d'acide thioglycolique (ou encore avec de l'acide mercaptoéthanesulfonique), une étape d'oxydation de la cystéine doit être rajoutée avant la détection des acides aminés par échange d'ions, pour éviter la surestimation de la proline par co-élution (Fountoulakis and Lahm, 1998). L'étape d'oxydation de la cystéine en cystine (4h d'exposition à l'air après l'hydrolyse) permet également d'obtenir une valeur plus précise de la teneur totale en cystéine plus cystine de la protéine (Moore and Stein, 1963).

b) Les autres acides aminés

La dégradation des autres acides aminés se produit généralement à un degré moindre (Roach and Gehrke, 1970). Certains auteurs notent par exemple la dégradation d'acides aminés labiles pendant la procédure, tels que la **cystine**, la **tyrosine**, la **sérine** et la **thréonine**

(Hirs *et al.*, 1954; Moore and Stein, 1963). Dans certaines expériences, l'**acide aspartique**, l'**acide glutamique**, la **proline** et l'**arginine** peuvent aussi être décomposées à un degré moindre (Hirs *et al.*, 1954), bien que Hirs *et al.* (1954) n'aient pas observé de pertes d'acide glutamique et d'acide aspartique lors de leur étude sur un mélange synthétique d'acides aminés. D'autres auteurs, comme Roach and Gehrke (1970) avancent également que la **proline** puisse être dégradée.

La **cystine** peut être significativement oxydée (Tsugita *et al.*, 1987). Elle est sensible à la fois à l'oxydation et à la réduction au cours de l'hydrolyse (Barkholt et Jensen, 1989).

La **tyrosine** a été observée comme étant entièrement détruite (Light and Smith, 1963, dans Roach and Gehrke, 1970) ou bien non affectée (Lugg, 1938, dans Roach and Gehrke, 1970). Cette destruction peut être réduite grâce à l'emploi d'une atmosphère de N₂ (Roach and Gehrke, 1970), et afin de maximiser la récupération de la tyrosine, il est nécessaire d'éliminer les traces d'air dissous dans le HCl avant de sceller le tube. Pour ce faire, une étape supplémentaire est réalisée par Moore et Stein (1963) : le tube contenant la protéine et le HCl est placé à basse température (bain de glace de dioxyde de carbone). Après solidification de l'échantillon, l'air est évacué du tube grâce à une pompe. Lorsque la pression est à 60 microns, le tube est retiré du bain de glace, afin que l'échantillon puisse retourner à l'état liquide (toujours sous l'action de la pompe). Des bulles se forment alors. Replacer le tube momentanément dans le bain de glace permet aux bulles d'éclater et au liquide de retourner au fond du tube. La **tyrosine** pourrait être halogénée en 3-chlorotyrosine par chlorination oxydative, pouvant être inhibée par l'ajout de phénol (Sanger et Thompson, 1963, dans Tsugita *et al.*, 1987) à 0.1% w/v (Ozols, 1990). Cette chlorination serait due à la présence de chlore libre dans le HCl (Munier, 1958; dans Roach and Gehrke, 1970).

La récupération de la **méthionine** dépend de la pression partielle d'oxygène dans le tube d'hydrolyse (Tsugita *et al.*, 1987). En effet, la **méthionine** peut être oxydée, particulièrement si le dégazage de l'échantillon est incomplet (Finley, 1985, dans Darragh *et al.*, 1996). L'ajout de 2-mercaptoethanol au HCl avant l'hydrolyse permet d'éviter ceci (Ozols, 1990). De plus, la **méthionine** peut être convertie en homocystine, homocystéine et glycine (Osono *et al.*, 1955, dans Roach and Gehrke, 1970). La méthionine est analysable en réalisant sa conversion en méthionine sulfone ou méthionine sulfoxyde selon les auteurs (Fountoulakis and Lahm, 1998; Ozols, 1990; respectivement), grâce à une étape pré-hydrolyse d'oxydation à l'acide performique (qui entraîne également la conversion de la cystéine et de la cystine en

acide cystéique, comme expliqué ci-dessus). La méthionine sulfoxide est un dérivatif stable lors de l'hydrolyse acide (Ozols, 1990). La méthionine sulfone a un taux de perte beaucoup plus faible que la méthionine (Darragh *et al.*, 1996). Cependant, tout comme dans le cas de la cystéine, cette méthode présente un intérêt seulement dans le cas où la méthionine est déjà présente à l'état libre avant l'hydrolyse. De plus, la méthionine n'a jamais été détectée dans des météorites.

La **lysine** (bien qu'étant considérée comme le plus stable des acides diamminés) peut être dégradée et donner les produits suivants : acide aspartique, glycine, acide glutamique et acide alpha-aminoadipique (Ishii, 1954, dans Roach and Gehrke, 1970).

L'**asparagine** et la **glutamine** sont désaminées en acide aspartique et acide glutamique, avec production d'ammonium (Snell, 1957, dans Keil and Kirchman, 1991). De l'acide aspartique et de l'acide glutamique ont été trouvés dans les météorites (*cf.* Burton *et al.*, 2012b). On pourrait donc se poser la question d'une présence potentielle d'asparagine et de glutamine, soit avant hydrolyse, soit par formation à partir de précurseurs au cours de l'hydrolyse. Il existe une méthode pour déterminer les quantités de glutamine et d'asparagine d'une protéine. Elle consiste à traiter la protéine au bis(1,1-trifluoroacétoxy)iodobenzène (BTI) avant l'hydrolyse. L'asparagine et la glutamine sont alors converties en acide diaminopropionique et acide diaminobutyrique (respectivement) (Soby et Johnson, 1981, dans Ozols, 1990). Cette méthode pourrait être appliquée aux extraits aqueux de météorites. Cependant, elle présente un intérêt seulement si l'asparagine et la glutamine sont présentes dans l'extrait aqueux. En effet, si l'acide aspartique et l'acide glutamique – observés dans l'extrait aqueux hydrolysé – sont formés à partir d'asparagine et de glutamine, eux-mêmes formés au cours de l'hydrolyse à partir de précurseurs, ou bien formés directement à partir de précurseurs autres que l'asparagine et la glutamine, cela implique que l'asparagine et la glutamine ne sont pas présentes dans l'extrait aqueux, et cette méthode ne présente pas un grand intérêt. L'asparagine et la glutamine n'ont jamais été détectées dans les météorites.

La **sérine** et la **thréonine** sont bien connues pour être avoir de faibles taux de récupération (*e.g.*, Hirs *et al.*, 1954; Rees, 1946; Roach and Gehrke, 1970; Tsugita *et al.*, 1987), à cause de leur dégradation par déshydratation (Tsugita *et al.*, 1987). Les pertes de sérine et de thréonine sont généralement aux alentours de 10 et 5%, respectivement (Moore and Stein, 1963; Ozols, 1990). Leur taux de décomposition peut varier avec la pureté du HCl utilisé (Rees, 1946, Hirs *et al.*, 1954 ; dans Roach and Gehrke, 1970). Leur degré de destruction est

également fonction de la composition de la protéine, de la température, du temps, et de la concentration en protéine (Light and Smith, 1963). La nature de la matière organique présente dans l'extrait aqueux de météorite pourrait donc potentiellement avoir un effet sur le degré de destruction de la sérine et de la thréonine au cours de l'hydrolyse acide.

c) Problèmes généraux

Lors de l'hydrolyse acide au HCl liquide, en tubes fermés, si les tubes ne sont pas assez évacués, l'oxydation peut conduire à la formation d'acide cystéique, de méthionine sulfoxide et de chlorotyrosine (Moore and Stein, 1963). Cependant, la méthionine sulfoxide peut être reconvertie en **méthionine** pendant l'hydrolyse (Ray et Koshland, 1960, dans Moore and Stein, 1963). La présence de l'ion sulfate SO_4^{2-} (à une concentration supérieure ou égale à 0.1 M) peut conduire à la formation de sulfosérine (Moore and Stein, 1963).

Lorsque l'hydrolysats est évaporé dans un dessiccateur à vide sur NaOH, l'**acide glutamique** et la **sérine** peuvent, sous conditions anhydres, par estérification, former la O-(γ -L-glutamyl)-L-sérine (Ikawa et Snell, 1961, dans Light and Smith, 1963). Une récupération totale de l'acide glutamique et de la sérine requièrent donc une évaporation rapide (*e.g.* avec un évaporateur rotatif) (Craig *et al.*, 1950, dans Light and Smith, 1963). Tsugita *et al.* (1987) ont réalisé une évaporation rotative et n'ont pas observé d'estérification entre la sérine et l'acide glutamique. Moore et Stein (1963) font également remarquer que lors de l'évaporation du HCl au dessiccateur pendant la nuit, la **sérine** et la **théonine** peuvent subir une dégradation encore plus importante, et de nouveaux pics apparaissent près du tryptophane, de la sérine, cystine et méthionine ; et que l'évaporation rapide du HCl après hydrolyse (*e.g.* par évaporation rotative) permet d'éviter ceci.

La présence de carbohydrates en solution peut entraîner la destruction de certains acides aminés : l'**arginine** (Tristan, 1939, dans Roach&Gehrke70), la **méthionine** (Bailey, 1937, dans Roach et Gehrke, 1970) et la **cystine** (Lugg, 1933, dans Roach et Gehrke, 1970). La condensation entre le **tryptophane** et les carbohydrates peut entraîner la formation d'une quantité considérable d'humine de couleur noire à marron. La formation d'humine peut être réduite par l'hydrolyse de la protéine avec 200 fois son poids en HCl exempt de métaux lourds (Stein et Moore, 1948, dans Light et Smith, 1963). L'utilisation d'un acide redistillé est

recommandée. L'hydrolyse dans un tube évacué et scellé permet également de réduire la formation d'humine (Smith et Stockell, 1954, dans Light et Smith, 1963).

Le taux de décomposition des acides aminés au cours de l'hydrolyse acide dépend de la concentration de l'acide, de sa pureté, de la durée et température de l'hydrolyse, et de la présence de carbohydrates, d'aldéhydes, de métaux (Roach et Gehrke, 1970). La présence de sels lors de l'hydrolyse d'une protéine peut entraîner des rendements variables pour plusieurs résidus (Fountoulakis et Lahm, 1998). Une différence de quelques degrés peut entraîner des variations significatives dans le taux de décomposition des acides aminés, particulièrement la sérine et la thréonine (Hirs *et al.*, 1954). Les hydrolyses d'extraits aqueux réalisées à 100°C ou 110°C pourraient donc aboutir à des résultats différents pour ces deux acides aminés. La présence de sels de phosphate ou de métaux divalents au cours de l'hydrolyse peut donner des rendements faibles et variables pour la plupart des acides aminés. Les tampons volatils, comme l'acétate d'ammonium, n'ont pas d'effets négatifs sur l'hydrolyse (Ozols, 1990). Sous les conditions extrêmes de l'hydrolyse, des espèces présentes dans l'échantillon ou dans le HCl peuvent réagir ou catalyser des réactions et ainsi affecter la quantification de certains acides aminés, en particulier la tyrosine, la méthionine et l'histidine (Fountoulakis et Lahm, 1998). Selon Fountoulakis et Lahm (1998), les échantillons devraient être exempts de sels d'ammonium ou d'urée, car ces substances génèrent de grandes quantités d'ammoniac NH_3 au cours de l'hydrolyse, qui peuvent affecter l'analyse chromatographique.

Durant l'hydrolyse de l'extrait aqueux de météorites, la nature de la matrice météoritique, et par conséquent la présence de diverses espèces chimiques dans l'extrait, pourrait donc avoir une influence sur les taux de dégradation des acides aminés labiles.

d) La correction des pertes

Il existe deux manières d'estimer les taux de dégradation des acides aminés : par étude de l'hydrolyse d'un mélange synthétique d'acides aminés (première méthode), et par étude de l'hydrolyse d'une protéine avec mesure de la quantité d'acides aminés à plusieurs temps au cours de l'hydrolyse (deuxième méthode).

Grâce à la première méthode, une correction peut être appliquée à la quantité en acides aminés trouvés. En effet, la connaissance des taux de dégradation des acides aminés labiles permet d'apporter une correction approximative aux quantités obtenues pour ces

derniers. Ceci permet d'estimer la composition d'une protéine à partir d'une seule analyse (Light and Smith, 1963; Moore and Stein, 1963).

Cependant, lors de l'hydrolyse d'une protéine, pour obtenir une estimation plus précise, il est nécessaire de réaliser plusieurs hydrolyses de durées différentes (*e.g.*, 20h et 70h, *cf.* Moore et Stein, 1963 ; ou bien 24h, 48h et 92h, *cf.* Ozols, 1990). Grâce à cette méthode, on peut estimer les quantités initiales des acides aminés labiles. En effet, les valeurs obtenues aux différents temps d'hydrolyse sont extrapolées au temps initial, en supposant une cinétique de premier ordre (Moore et Stein, 1963). De plus, l'intérêt de réaliser plusieurs durées d'hydrolyse est de réaliser un compromis entre la minimisation des pertes en acides aminés (durée de 24h) et le clivage complet de toutes les liaisons aliphatiques (durée de 92h) (Ozols, 1990). Par cette méthode, Darragh *et al.* (1996) ont notamment déterminé les taux de dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse du lysozyme de blanc d'œuf et ont mis en évidence une perte pour la plupart des acides aminés après un certain temps.

Ces méthodes de correction pourraient également être appliquées à l'analyse des acides aminés contenus dans les météorites.

Ainsi, l'hydrolyse acide au HCl 6M en phase liquide entraîne bien des pertes, variables selon différents facteurs relatifs aux conditions de l'hydrolyse. On peut cependant corriger les quantités en acides aminés obtenus à partir des protéines, grâce aux taux de dégradation calculés.

1.5.1.3) Données quantitatives obtenues par le travail sur des standards

Certaines études se sont intéressées aux pertes quantitatives entraînées par la procédure d'hydrolyse sur des mixtures synthétiques d'acides aminés.

Par exemple, Rees (1946) (hydrolyse en phase liquide, HCl 6,5M, 110°C, 24h) (l'auteur ne précise pas la température de l'hydrolyse mais indique que son protocole est le protocole standard pour les protéines, on peut donc supposer 110°C) a hydrolysé séparément la sérine et la thréonine. Il a montré un recouvrement de la sérine et de la thréonine de 89,5% et 94,7%, respectivement.

Corfield et Robson (1953) (phase liquide, HCl 5.5N, 24h ; température non précisée), en hydrolysant les sept acides aminés constituant la salmine (isoleucine, alanine, valine,

glycine, sérine, proline, arginine), ont montré des pertes supérieures à 2% uniquement pour la sérine (8,9% et $9\pm 1\%$ selon la technique, libération d'ammoniac et méthode du cuivre radioactif, respectivement). L'arginine a subi 0.31% de pertes, et les pourcentages de pertes ne sont pas donnés pour les autres acides aminés.

Roach et Gehrke, 1970 (phase liquide, HCl 6M, 145°C, 2-9h ; sachant que les auteurs considèrent que l'hydrolyse d'une protéine à 145°C pendant 4h correspond à l'hydrolyse à 110°C pendant 24h), ont obtenu un recouvrement presque complet pour tous les acides aminés, sauf la proline, la thréonine, la sérine, la méthionine, l'hydroxyproline et l'arginine. Les auteurs avancent que ces derniers sont les plus sensibles à la chaleur.

Moore et Stein (1963) (phase liquide, HCl 6M, 110°C, 20h) indiquent que l'hydrolyse de mélanges synthétiques d'acides aminés a montré une décomposition d'environ 10% en 20h pour la sérine ; et d'environ 5% en 20h pour la thréonine, cystine et tyrosine.

Keil and Kirchman (1991) (phase liquide, HCl 6M, 110°C, 20h ; phase gazeuse, HCl 6M, 156°C, 23 min, *i.e.* la méthode de Tsugita *et al.*, 1987), lors de l'hydrolyse des acides aminés individuels en phase liquide et phase gazeuse ont obtenu des recouvrements proches de 100%, sauf pour l'asparagine, glutamine, tryptophane et histidine (qui est pourtant habituellement stable lors de l'hydrolyse, et les auteurs n'en connaissent pas la raison ; *cf.* Keil and Kirchman, 1991). Lors de leur analyse, l'alanine a co-élué avec la tyrosine, la glycine avec la thréonine, et l'acide aspartique et l'acide glutamique ont été désaminés en asparagine et glutamine, respectivement.

Hirs *et al.* (1954) (hydrolyse en phase liquide, HCl 6M, 110°C, 22h), ont réalisé l'hydrolyse d'un mélange de sérine, thréonine, cystine et tyrosine. Ils ont également déterminé, par calcul, les taux de recouvrement à $t = 0$ pour la sérine (98,6%), thréonine (98,7%), tyrosine (97,3%) et cystine (104%).

Concernant la sérine et la thréonine (acides aminés généralement reconnus comme labiles lors de l'hydrolyse acide), par travail sur des standards, Rees (1946) a montré une décomposition de la sérine et de la thréonine d'environ 10% et 5% (respectivement), tandis que Hirs *et al.* (1954) ont montré des pertes d'environ 16% et 8% pour la sérine et la thréonine (respectivement). De manière plus détaillée, selon les études (toujours sur standards), le recouvrement de la sérine peut varier de 83.7% (Hirs *et al.*, 1954) à $118\pm 21\%$ (Keil and Kirchman, 1991) (voir aussi Corfield and Robson, 1953; Hirs *et al.*, 1954; Moore and Stein, 1963; Rees, 1946; dans Roach and Gehrke, 1970; Roach and Gehrke, 1970) ; alors que la

recupération de la thréonine peut varier de 92,4% (Hirs *et al.*, 1954) à environ 95% (Moore et Stein, 1963) (voir aussi Rees, 1946; Roach and Gehrke, 1970), pour l'hydrolyse liquide au HCl 6M.

Globalement, selon les études, les pourcentages de recouvrement vont de 0% (pour le tryptophane ou l'asparagine) à 118% ($\pm 21\%$) pour la sérine. De plus amples détails sont disponibles dans le tableau I-4.

Acides aminés	Durée de l'hydrolyse							
	20-24h							0h
	1	2	3	4	5	6	Résumé	7
Alanine*°		>98	101,8		87 \pm 20 ^a		87-101,8	
Glycine*°		>98	99,7		112 \pm 33 ^b		99,7->98	
Valine*°		>98	100,9		84 \pm 14		84-100,9	
Leucine*°			98,8		92 \pm 9		92-98,8	
Isoleucine*°		>98	102,9		91 \pm 8		91-102,9	
Proline*°		>98	94,6				94,6->98	
Methionine°			90,6		88 \pm 9		88-90,6	
Sérine*°	89,5	91,1	90,5	\approx 90	118 \pm 21	83,7	83,7-118	98,6
Thréonine*°	94,7		93,2	\approx 95		92,4	92,4- \approx 95	98,7
Phénylalanine*°			97,7		87 \pm 11		87-97,7	
Acide aspartique*°			98,9		88 \pm 9 ^c		98,9	
Acide glutamique*°			100,7		124 \pm 28 ^d		100,7	
Lysine°			97,4				97,4	
Arginine°		99,7	88,1		71 \pm 10		71-99,7	
Histidine°			97,5		24 \pm 11		24-97,5	
Tyrosine*°			100	\approx 95		89,7	89,7-100	97,3
Cystine°			97,1	\approx 95		96,2	\approx 95-97,1	104
Acide α -aminobutyrique*					94 \pm 14		94	
Asparagine					0 \pm 0		0	
Acide cystéique					113 \pm 21		113	
Tryptophane					0		0	
Hydroxyproline			94,7				94,7	

Tableau I-4 : recouvrement (%) des acides aminés lors de de l'hydrolyse au HCl en phase liquide. ^a

Alanine plus tyrosine (co-élution) ; ^b Glycine plus thréonine (co-élution) ; ^c Acide aspartique plus asparagine (désamination) ; ^d Acide glutamique plus glutamine (désamination). 1. Rees, 1946. HCl 6,5N, 110°C, 24h. 2. Corfield et Robson, 1953. HCl 5,5N, ?°C, 24h. 3. Roach et Gehrke, 1970, Table VI. HCl 6M, 145°C, 4h (approximativement équivalent à 110°C, 24h; selon les auteurs). 4. Moore et Stein, 1963. HCl 6M, 110°C, 20h. 5. Keil et Kirchman, 1991. HCl 6M, 110°C, 20h. 6. Hirs *et al.*, 1954. HCl 6M, 110°C, 22h. 7. Hirs *et al.*, 1954. HCl 6M, 110°C, 0h (calculé). Les intervalles d'erreurs sont indiqués

lorsqu'ils sont donnés dans les articles. * Acides aminés détectés dans des météorites. ° Acides aminés étudiés au cours de cette thèse.

Pour information, Tsugita *et al.*, (1987) ont mesuré la dégradation de la sérine et la thréonine (sous forme d'un mélange standard) au cours de l'hydrolyse (phase gazeuse, HCl 7M, 158°C, 20-60 min). Il est intéressant de noter que Ozols (1990) considère une hydrolyse sur protéine en phase vapeur d'une heure à 150°C comme donnant des résultats comparables à une hydrolyse à 110°C pendant 20h, et qu'en 90 min à 150°C, environ 50% de sérine et 40% de thréonine sont perdus. L'hydrolyse en phase vapeur à 150°C pendant 3h serait donc plus agressive envers les acides aminés labiles que l'hydrolyse en phase liquide traditionnelle, malgré la réduction des contaminants. Cependant, Glavin *et al.* (2010) ont montré que l'ensemble de la procédure d'extraction et d'hydrolyse en phase vapeur (3h, 150°C) sur un standard d'acides aminés n'entraînait pas de pertes.

1.5.1.4) Implications concernant les acides aminés météoritiques

Parmi les 22 acides aminés du tableau I-4, 13 ont été détectés dans les météorites : l'alanine, la glycine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la tyrosine et l'acide α -aminobutyrique (*cf.* Burton *et al.*, 2012, tableau 2). Ils sont indiqués par le symbole * dans le tableau I-4.

Shock et Schulte (1990) avaient prédit qu'une catégorie d'acides aminés particulièrement labiles pouvaient être détruits pendant l'extraction et l'hydrolyse acide des météorites. Après avoir dopé un échantillon de Murchison (préalablement débarassé de sa matière organique soluble par extraction) avec un standard d'acides aminés, suivi d'une extraction à l'eau (100°C, 8h) et hydrolyse acide (en phase liquide, HCl 6M, 24h à 100°C, sans atmosphère inerte) puis d'une étape de dessalage (desalting) et analyse par analyseur d'acides aminés, Bada *et al.* (1983) ont montré une perte complète de la **méthionine** et une décomposition importante de la **tyrosine** et la **phénylalanine**, attribués pour la méthionine à une oxydation en son sulphone et sulphoxide, et pour la tyrosine à sa chlorination due à la réalisation de l'extraction et de l'hydrolyse en présence d'air.

Nous proposons au cours de cette thèse de réaliser l'hydrolyse acide au HCl, pendant 24h à 100°C, sous atmosphère inerte, d'un mélange synthétique de 17 acides aminés : l'alanine, la glycine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la méthionine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la lysine, l'arginine, l'histidine, la tyrosine et la cystine (notés par le symbole ° dans le tableau I-4).

Parmi les 13 acides aminés détectés dans les météorites et pour lesquels les taux de recouvrement après hydrolyse ont été mesurés, 12 seront donc étudiés au cours de cette thèse : la glycine, l'alanine, la sérine, la thréonine, l'acide aspartique, la valine, l'acide glutamique, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la tyrosine et la proline.

Les 5 acides aminés restants du mélange standard utilisé (l'arginine, la cystine, l'histidine, la lysine, et la méthionine) n'ont pas été détectés dans les météorites, mais leurs taux de recouvrement suite à l'hydrolyse acide ont été mesurés par le passé. Pour plus de clarté, cf. figure I-34.

Cependant, bien que les taux de recouvrement de tous ces acides aminés aient été étudiés, ils n'ont jamais tous été hydrolysés ensemble au sein d'une même analyse. Il sera donc intéressant de comparer nos résultats avec les résultats obtenus précédemment.

De plus, bien que l'ensemble des études présentées ci-dessus se situent dans les conditions de l'hydrolyse acide « traditionnelle », aucune étude ne s'est placée strictement à 24h pendant 100°C, sous atmosphère inerte, en présence de HCl 6M.

Finalement, aucune étude n'a mesuré la perte en acides aminés lors d'un contact rapide, sans chauffage, avec une solution de HCl 6M. Tous ces résultats seront présentés dans le chapitre II de ce manuscrit.

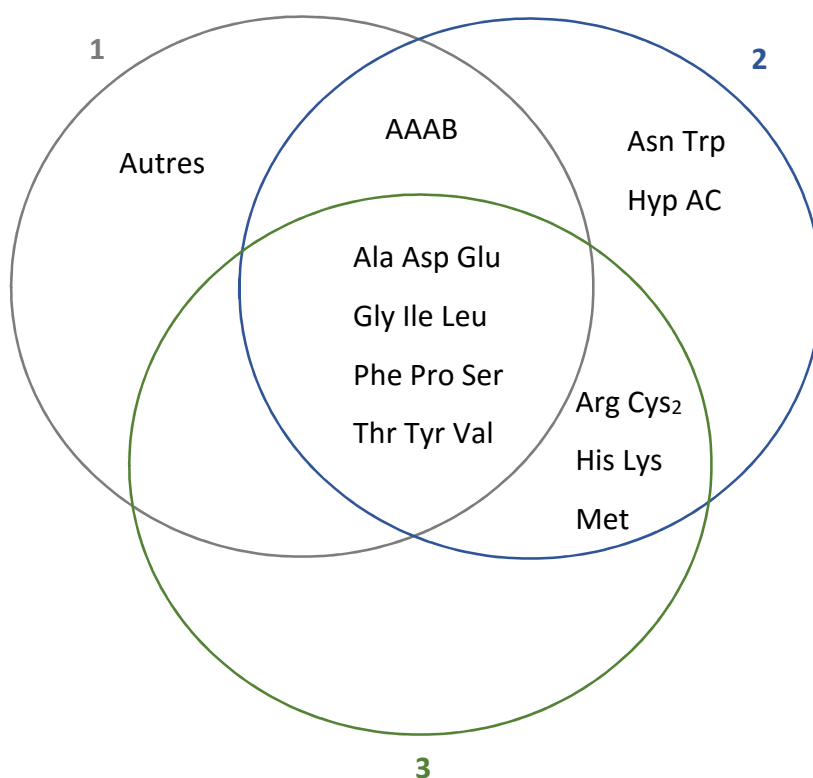


Figure I-34 : diagramme de Venn représentant (1) les acides aminés détectés dans des météorites, (2) les acides aminés pour lesquels des données sur la dégradation lors de l'hydrolyse d'un mélange synthétique / de l'acide aminé individuel existent, et (3) les acides aminés présents dans le mélange synthétique utilisé dans cette étude. AAAB : acide α -aminobutyrique ; Asn : asparagine ; Trp : tryptophane ; Hyp : hydroxyproline ; AC : acide cystéique ; Ala : alanine ; Asp : acide aspartique ; Glu : acide glutamique ; Gly : glycine ; Ile : isoleucine ; Leu : leucine ; Phe : phénylalanine ; Pro : proline ; Ser : sérine ; Thr : thréonine ; Tyr : tyrosine ; Val : valine ; Arg : arginine ; Cys₂ : cystine ; His : histidine ; Lys : lysine ; Met : méthionine.

L'observation d'une diminution de la quantité d'acides aminés après hydrolyse pourrait être due à la dégradation subie par les acides aminés lors de l'hydrolyse. Cependant, la fonctionnalisation pré-colonne au MTBSTFA utilisée dans notre étude pour l'analyse des acides aminés pourrait également souffrir d'une diminution de rendement. Ceci serait dû à la présence de sels produits lors l'hydrolyse acide et interférant avec la réaction de fonctionnalisation. Il est donc important de s'intéresser au rendement de cette fonctionnalisation, non seulement dans le cadre de l'hydrolyse acide au laboratoire, mais également dans le cadre de la recherche de molécules organiques dans les environnements extraterrestres. En effet, le MTBSTFA est utilisé dans les missions d'exobiologie martienne. La

nature de la matrice minérale pourrait donc avoir un effet sur le rendement de la réaction de fonctionnalisation. Nous allons donc maintenant nous intéresser à l'influence de diverses matrices minérales sur le rendement de la fonctionnalisation au MTBSTFA.

1.5.2) Impact de la minéralogie martienne sur la fonctionnalisation au MTBSTFA, minéralogies choisies et analogues utilisés

1.5.2.1) Impact de la minéralogie sur la fonctionnalisation au MTBSTFA :

Un des désavantages de la fonctionnalisation pré-colonne est l'effet de la matrice sur l'efficacité de la réaction. Lors de l'analyse d'échantillons extraterrestres, la nature de la matrice minérale contenant les molécules organiques cibles peut avoir une influence sur l'efficacité de la fonctionnalisation. Notamment, il est reconnu que le MTBSTFA est sensible à l'humidité, et que la présence d'humidité engendre de faibles rendements de réaction et une instabilité des analytes fonctionnalisés (Stenerson, 2007).

L'effet de la matrice minérale sur l'efficacité de la fonctionnalisation au MTBSTFA peut être de deux ordres :

(i) Effet direct sur le MTBSTFA :

- Le MTBSTFA peut réagir préférentiellement avec d'autres espèces que les molécules organiques cibles. En effet, la fonctionnalisation au MTBSTFA est une réaction de silylation, et le mécanisme de la silylation est généralement considéré comme analogue à une substitution nucléophile de type 2 (S_N2) (Moldoveanu and David, 2002; cf. paragraphe 2.4.2.1.a au chapitre II de la thèse). Ainsi, n'importe quelle espèce donneuse d'électrons, c'est-à-dire nucléophile (tel qu'un anion ou un atome portant un doublet d'électrons non-liants) ou porteuse d'un hydrogène labile (hydrogène lié à un des éléments suivants : O, N, S), peut réagir avec le MTBSTFA et réduire le rendement de fonctionnalisation des espèces cibles. Le MTBSTFA peut donc réagir avec de l'eau (eau libre ; ou eau liée au sein de minéraux, telle que l'eau inter-feuillets des phyllosilicates ou l'eau de cristallisation de certains minéraux), ou

possiblement avec des groupements -OH présents dans les minéraux, ou encore des sels (l'interférence chimique des sels, *cf.* Buch *et al.*, 2006). Différents sels ont été détectés sur Mars (sulfates, carbonates, chlorures, perchlorates).

- Le MTBSTFA peut être oxydé lors de la réaction de fonctionnalisation en présence d'agents oxydants, tels que des oxydes de fer ou des perchlorates contenus dans le sol.

(ii) Effet sur les molécules organiques et leurs produits de fonctionnalisation:

- Il peut y avoir un effet destructif, au cours de la procédure d'extraction / fonctionnalisation au MTBSTFA en présence de *N,N*-diméthylformamide (DMF), sur les molécules organiques présentes dans le sol et sur leurs produits de fonctionnalisation (les molécules organiques fonctionnalisées) :

- Hydrolyse des molécules organiques et / ou des produits de la fonctionnalisation, liée à la présence d'eau (libre ou liée).

- Oxydation des molécules organiques et / ou des produits de la fonctionnalisation, liée à la présence d'agents oxydants (oxydes de fer ou perchlorates). Navarro-González *et al.* (2006) ont montré que l'oxydation de la matière organique en CO₂, lors d'une procédure de thermodésorption, était causée par la présence d'oxydes de fer dans des analogues martiens. La réaction de fonctionnalisation au MTBSTFA sur SAM se faisant à 300°C pendant 2 minutes (expérience encore non réalisée), on pourrait donc s'attendre à une oxydation de la matière organique.

- Il peut également y avoir une non-disponibilité des molécules organiques pour la fonctionnalisation, par liaison entre le H acide et l'atome de silicium du sol. Les molécules fonctionnalisées peuvent également être absorbées des sels (l'interférence physique des sels, *cf.* Buch *et al.*, 2006).

Les effets dûs aux sels (interférence physique et interférence chimique) ont été testés par Buch *et al.* (2006), pour le CaSO₄. Les auteurs ont montré que la présence de CaSO₄ n'avait pas d'influence sur l'efficacité de la fonctionnalisation d'acides aminés et de bases nucléiques.

Les deux principaux facteurs problématiques de la minéralogie sont donc les suivants :

(i) La présence d'eau (libre, ou liée au sein de minéraux hydratés et relâchée à faibles températures), pouvant causer l'inhibition de la fonctionnalisation des molécules organiques (par réaction préférentielle du MTBSTFA avec l'eau), et l'hydrolyse des molécules organiques et des produits de la fonctionnalisation, au cours de la réaction de fonctionnalisation,

(ii) La présence d'espèces telles que :

- Des agents oxydants (*e.g.* oxydes, perchlorates) pouvant causer ou catalyser une oxydation du MTBSTFA, des molécules organiques, et des produits de la fonctionnalisation, au cours de la réaction de fonctionnalisation,

- Des sels, pouvant réagir avec le MTBSTFA, les molécules organiques et les produits de la fonctionnalisation (interférence chimique des sels), ou bien absorber les molécules organiques et / ou leurs produits de fonctionnalisation (interférence physique des sels),

- Des minéraux liés aux molécules organiques par liaison H-Si, ou réagissant avec le MTBSTFA du fait de la présence de groupements –OH.

1.5.2.2) Minéralogies choisies

Sachant cela, il est possible de sélectionner, parmi les analogues martiens connus, des analogues possédant les minéralogies nous intéressant. Après un travail bibliographique ayant permis de recenser les différents types de minéralogies en présence sur Mars (*cf.* paragraphe 1.3.6.3), et les analogues terrestres correspondants, nous avons choisi comme caractéristiques d'intérêt la présence d'agents oxydants, et la présence d'eau. Ces deux caractéristiques sont celles étant suspectées comme étant responsables des faibles rendements de fonctionnalisation au MTBSTFA obtenus sur certains analogues martiens (Stalport *et al.*, 2012).

Les minéralogies détectées sur Mars présentant ces caractéristiques sont les suivantes :

(i) Minéraux hydratés contenant de l'eau facilement libérée lors d'un chauffage à faible température (celle de la fonctionnalisation): certains phyllosilicates (ceux pouvant absorber de l'eau entre leurs feuillets, tels que la smectite), certains sulfates hydratés (ceux possédant de l'eau de cristallisation $\cdot n(\text{H}_2\text{O})$).

(ii) Présence d'agents oxydants: oxydes et (oxy)hydroxydes de fer, perchlorates.

Notre choix a également été influencé par les minéralogies susceptibles d'être rencontrées sur Mars. Cela inclut les phyllosilicates et les sulfates, minéraux détectés depuis l'orbite au sein du cratère Gale (Anderson and Bell III, 2010), et dont la présence a été confirmée *in situ* par l'instrument SAM de la mission MSL (Vaniman et al., 2014). Cela inclut également des minéraux qui pourront être rencontrés lors de futures missions, tels que les carbonates. Il est également intéressant de prendre en compte le fait que la présence de phyllosilicates, de sulfates et de carbonates soit indicatrice d'un environnement humide dans le passé, et donc potentiellement de conditions permettant le développement d'une éventuelle vie microbienne (avec un potentiel plus fort pour les phyllosilicates puisque résultant d'une interaction de longue durée entre l'eau et les minéraux primaires). De plus, comme précisé au paragraphe 1.3.6.4.b, les phyllosilicates, sulfates et carbonates peuvent préserver des bioindices / biomarqueurs potentiels.

1.5.2.3) Analogues utilisés

Les analogues de sol martien sont des sols Terrestres possédant certaines caractéristiques similaires à certains sols martiens. Ils permettent de simuler les expériences qui sont réalisées sur Mars. Il en existe différents types, en fonction des propriétés du régolithe martien qu'ils simulent (analogues chimiques, mécaniques, physiques, magnétiques, organiques ; Marlow *et al.*, 2008). Les lieux incluent par exemple Hawaii, Salten Skov, le désert d'Atacama, le désert de Mojave, Arequipa, ou encore Rio Tinto. Les analogues nous intéressent ici sont ceux possédant des caractéristiques minéralogiques en commun avec le régolithe martien. Les analogues sur lesquels nous avons choisi de travailler sont les suivants :

a) Atacama (sol oxydant)

Le désert d'Atacama s'étend entre 18°S et 27°S le long de la côte Pacifique de l'Amérique du Sud. Il est utilisé en tant qu'analogue martien, du fait de son climat extrêmement sec et de son environnement oxydant. La nature **oxydante** du sol est possiblement liée à la présence d'acides forts (par exemple les acides sulfurique et nitrique) se déposant depuis l'atmosphère, et entraînant la formation de composés oxydants par le biais de réactions photochimiques aux interfaces sol / poussière / atmosphère (Navarro-González *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2005). Ces conditions ont contribué à la présence de sols appauvris en formes de vie et en matière organique (Navarro-González *et al.*, 2006).

La région hyperaride de Yungay (figure I-35) est connue comme étant la région la plus aride d'Atacama (Shirey et Olson, 2012). Cette région présente en surface des sols analogues au sol martien, contenant un oxydant non identifié (Navarro-González *et al.*, 2003, dans Navarro-González *et al.*, 2006).

Le désert d'Atacama est également connu pour ses dépôts importants de nitrates, contenant des espèces fortement oxydantes, incluant des ions iodate (IO_3^-), chromates (CrO_4^{2-}), et perchlorates (ClO_4^-) (Ericksen, 1981, dans Quinn *et al.*, 2005). Sur Terre, le perchlorate d'origine naturelle est présent à des niveaux équivalents à ceux du sol martien uniquement dans le désert d'Atacama, où les concentrations maximales en perchlorate atteignent environ 0,6% de la masse du sol (dans des veines de nitrate connues sous le nom de « caliche blanco ») (Ericksen, 1981, dans Catling *et al.*, 2010).

L'échantillon analysé, collecté en 2003 au site AT02-22 (28°07'04-5"S 69°55'08-0"W) provient d'une région moins aride du désert d'Atacama (Las Juntas, Chili) (Navarro-González *et al.*, 2006). En effet, les sites les plus au sud (AT01, AT02 ; cf. figure I-35) sont considérés comme des environnements « plus humides », par rapport aux sites septentrionaux (AT04, 05 et 08), qui sont dans la gamme de l'hyperaridité extrême (le site AT03 représentant quant à lui une transition entre des conditions hyperarides et hyperarides extrêmes) (Shirey and Olson, 2012).

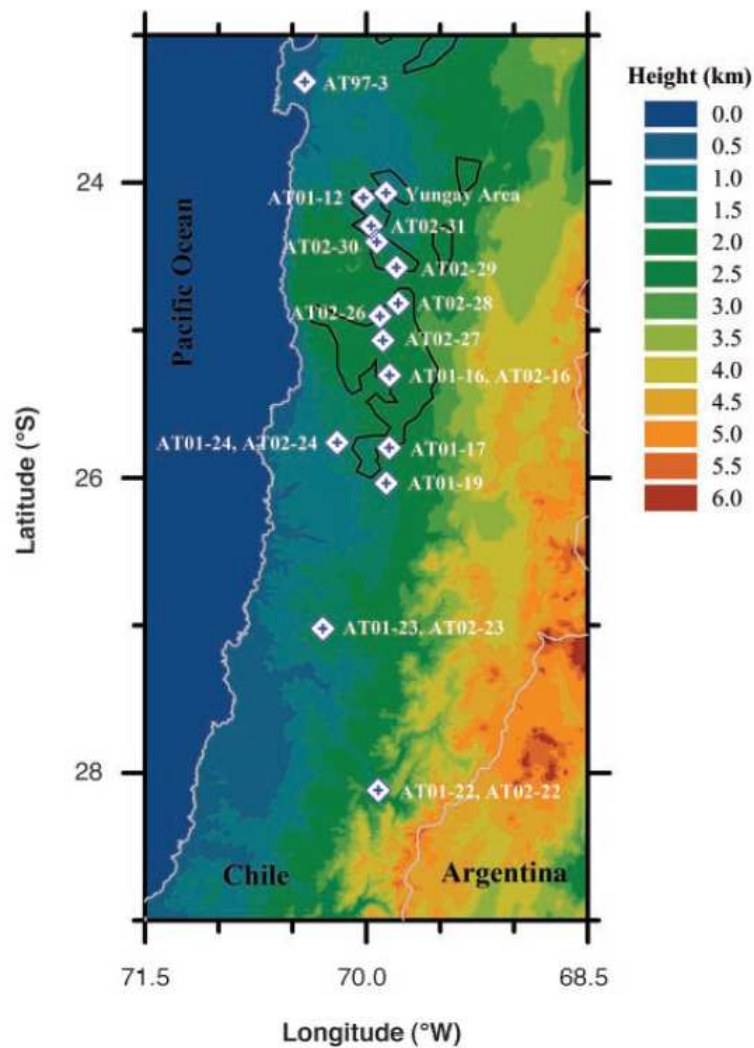


Figure I-35 : carte numérique de terrain du désert d'Atacama, dans le nord du Chili, montrant les différents sites d'échantillonnage (dans Navarro-González *et al.*, 2003)

b) Svalbard (minéral hydraté)

Svalbard est un archipel Norvégien situé entre 77 et 80°N, et est considéré comme un site analogue à Mars pour son climat froid et la présence de carbonates, sources chaudes et volcanisme (Steele *et al.*, 2006). L'échantillon analysé, collecté pendant la campagne AMASE 2011 (Arctic Mars Analog Svalbard Expedition), provient de Scott Keltie (AM11-155) et est principalement constitué de smectite (un **phyllosilicate** résultant de la météorisation des basaltes en argiles, capable d'absorber de l'eau entre ses feuillets), et de traces de magnésite (un **carbonate**). Ces deux minéraux ont été détectés sur Mars. Ce site est utilisé comme analogue au site d'atterrissage de MSL (le cratère Gale).

c) Rio Tinto (sels hydratés)

Les sources de Rio Tinto en Espagne sont enrichies en acide sulfurique et en ions ferriques. Ce site est utilisé comme analogue aux roches sédimentaires riches en sulfates et hématite exposées dans des cratères et autres structures de surface, analysées par le rover Opportunity dans Meridiani Planum. L'échantillon dont nous disposons est un sédiment collecté en 2003 (site « Headwaters Spring A »). Stalport *et al.* (2012) ont réalisé une analyse par DRX / SFX (Spectrométrie de Fluorescence des rayons X, ou « X-Ray Fluorescence », XRF en Anglais) de cet échantillon grâce à l'instrument Terra (analogue de l'instrument CheMin sur Curiosity). Les auteurs ont montré que cet échantillon (nommé Rio Tinto-01 dans leur étude) est constitué d'alunogène (sulfate d'aluminium de formule $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$) (40,1%), de jarosite (sulfate de potassium et de fer de formule $\text{KFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) (36,2%), d'amarantite (sulfate de fer de formule $\text{Fe}_2^{3+}(\text{SO}_4)_2\text{O} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (12%), et de copiapite (sulfate de fer de formule $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_4^{3+}(\text{SO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 20\text{H}_2\text{O}$) (11,6%) (Stalport *et al.*, 2012). Cet échantillon est donc entièrement constitué de **sulfates hydratés**. Aucune molécule organique n'a été détectée dans cet échantillon après fonctionnalisation au MTBSTFA (tableau 1 dans Stalport *et al.*, 2012).

Ces trois analogues permettent de couvrir plusieurs des minéralogies d'importance dans le cadre de l'étude de l'influence de la minéralogie sur la fonctionnalisation au MTBSTFA : la présence de minéraux hydratés contenant de l'eau facilement libérée lors d'un chauffage à faible température (sulfates hydratés de Rio Tinto, smectite de Svalbard), la présence de sels (sulfates de Rio Tinto), la présence de minéraux s'étant formés en milieu aqueux (smectite de Svalbard, sulfates hydratés de Rio Tinto), et la nature oxydante de la matrice (Atacama). Nous proposons de tester l'influence de ces différentes matrices minérales sur l'efficacité de la fonctionnalisation d'un mélange standard d'acides aminés. Ces résultats seront présentés dans le chapitre III de ce manuscrit.

1.5.3) Conclusion

Les protocoles utilisés dans le cadre de la recherche de bioindices dans les matrices extraterrestres, que ce soit dans au laboratoire dans des météorites, ou *in situ* dans le régolithe martien, ne sont pas sans biais. L'hydrolyse acide peut avoir un effet destructeur sur les acides aminés extraits des météorites, et l'efficacité de la fonctionnalisation au MTBSTFA peut être réduite (jusqu'à la non-détection des molécules organiques cibles) par la matrice minérale.

1.6) Conclusion

La réponse à la question de l'origine de la vie sur terre peut trouver des éléments de réponse dans les milieux extraterrestres. Pour cela, il faut chercher des indices ou des preuves d'une vie passée ou présente dans ces milieux. Etant donné les techniques scientifiques et les objets d'étude à disposition, certains milieux sont plus étudiés que d'autres, c'est le cas de Mars et des météorites. La présence d'une vie pluricellulaire sur Mars étant peu probable, il est plus pertinent de rechercher des indices de vie sous la forme de monomères de biopolymères. Après avoir listé les différents bioindices, parmi ceux-ci, nous avons sélectionné les acides aminés, qui représentent un objet d'étude particulièrement intéressant. En effet, même si la vie n'a jamais existé sur Mars, on devrait pouvoir y trouver des acides aminés, apportés de manière exogène, notamment par les météorites. Il est donc également intéressant de rechercher les acides aminés dans les météorites.

Au laboratoire, pour l'analyse des météorites, une étape supplémentaire d'hydrolyse acide est réalisée afin de pouvoir détecter les acides aminés en plus grand nombre. En effet, des acides aminés sont produits / libérés au cours de l'hydrolyse (acides aminés liés), à partir de précurseurs, venant s'ajouter aux acides aminés détectés sans hydrolyse acide (acides aminés libres). Cependant, cette étape d'hydrolyse peut dégrader les acides aminés. La présence de sels suite à l'hydrolyse peut également affecter le rendement de la fonctionnalisation. La mesure des quantités d'acides aminés détectés après hydrolyse acide fera l'objet du chapitre II.

La technique la plus adaptée à la recherche d'acides aminés sur Mars est la CPG-SM (utilisée notamment par SAM et MOMA). Afin de permettre l'analyse des acides aminés, une étape d'extraction / fonctionnalisation est réalisée au préalable. Parmi les différents types de

fonctionnalisation utilisés, nous avons choisi de nous intéresser à la fonctionnalisation au MTBSTFA / DMF, technique utilisée par les missions spatiales actuelles (comme SAM et MOMA), notamment pour la recherche des acides aminés. Cependant, la minéralogie du régolithe martien peut interagir avec la réaction de fonctionnalisation au MTSBTFA et donc avoir une influence négative sur le rendement de la fonctionnalisation. Nous avons donc listé les différentes minéralogies présentes sur Mars et sélectionné trois analogues martiens en fonction de leur influence sur l'efficacité de la fonctionnalisation au MTBSTFA et de leur importance vis-à-vis de la recherche de molécules organiques sur Mars. La mesure de l'influence de ces analogues sur le rendement de la fonctionnalisation des acides aminés fera l'objet du chapitre III.

1.7) Références

- Abelson, P.H., 1966. CHEMICAL EVENTS ON THE PRIMITIVE EARTH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 1365–1372.
- Amashukeli, X., Pelletier, C.C., Kirby, J.P., Grunthaner, F.J., 2007. Subcritical water extraction of amino acids from Atacama Desert soils. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 2005–2012 112.
- Anbar, A.D., Duan, Y., Lyons, T.W., Arnold, G.L., Kendall, B., Creaser, R.A., Kaufman, A.J., Gordon, G.W., Scott, C., Garvin, J., Buick, R., 2007. A Whiff of Oxygen Before the Great Oxidation Event? *Science* 317, 1903–1906. doi:10.1126/science.1140325
- Andersen, T.T., 1994. Practical amino acid analysis. *ABRF News* 5, 11–14.
- Anderson, J.D., Schubert, G., Jacobson, R.A., Lau, E.L., Moore, W.B., Sjogren, W.L., 1998. Europa's Differentiated Internal Structure: Inferences from Four Galileo Encounters. *Science* 281, 2019–2022. doi:10.1126/science.281.5385.2019
- Anderson, R., Bell III, J., 2010. Geologic mapping and characterization of Gale Crater and implications for its potential as a Mars Science Laboratory landing site. *Mars J.* 5, 76–128. doi:10.1555/mars.2010.0004
- Arndt, N., 2011. Hydrothermal environments, in: *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Science & Business Media, p. 786.
- Arvidson, R.E., Poulet, F., Bibring, J.-P., Wolff, M., Gendrin, A., Morris, R.V., Freeman, J.J., Langevin, Y., Mangold, N., Bellucci, G., 2005. Spectral Reflectance and Morphologic Correlations in Eastern Terra Meridiani, Mars. *Science* 307, 1591–1594. doi:10.1126/science.1109509
- Arvidson, R.E., Squyres, S.W., Bell, J.F., Catalano, J.G., Clark, B.C., Crumpler, L.S., Souza, P.A. de, Fairén, A.G., Farrand, W.H., Fox, V.K., Gellert, R., Ghosh, A., Golombek, M.P., Grotzinger, J.P., Guinness, E.A., Herkenhoff, K.E., Jolliff, B.L., Knoll, A.H., Li, R., McLennan, S.M., Ming, D.W., Mittlefehldt, D.W., Moore, J.M., Morris, R.V., Murchie, S.L., Parker, T.J., Paulsen, G., Rice, J.W., Ruff, S.W., Smith, M.D., Wolff, M.J., 2014.

- Ancient Aqueous Environments at Endeavour Crater, Mars. *Science* 343, 1248097. doi:10.1126/science.1248097
- Atreya, S.K., Mahaffy, P.R., Wong, A.-S., 2007. Methane and related trace species on Mars: Origin, loss, implications for life, and habitability. *Planet. Space Sci.* 55, 358–369. doi:10.1016/j.pss.2006.02.005
- Bada, J.L., Cronin, J.R., Ho, M.S., Kvenvolden, K.A., Lawless, J.G., Miller, S.L., Oro, J., Steinberg, S., 1983. On the reported optical activity of amino acids in the Murchison meteorite.
- Bada, J.L., Glavin, D.P., McDonald, G.D., Becker, L., 1998. A search for endogenous amino acids in Martian meteorite ALH84001. *Science* 279, 362.
- Bandfield, J.L., 2002. Global mineral distributions on Mars. *J. Geophys. Res. Planets* 107, 9–1–9–20. doi:10.1029/2001JE001510
- Barkholt, V., Jensen, A.L., 1989. Amino acid analysis: Determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal. Biochem.* 177, 318–322. doi:10.1016/0003-2697(89)90059-6
- Becker, L., Glavin, D.P., Bada, J.L., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Antarctic Martian meteorites, carbonaceous chondrites, and polar ice. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 475–481. doi:10.1016/S0016-7037(96)00400-0
- Becker, L., Popp, B., Rust, T., Bada, J.L., 1999. The origin of organic matter in the Martian meteorite ALH84001. *Adv. Space Res.* 24, 477–488. doi:10.1016/S0273-1177(99)00090-3
- Benner, S.A., Devine, K.G., Matveeva, L.N., Powell, D.H., 2000. The missing organic molecules on Mars. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2425–2430. doi:10.1073/pnas.040539497
- Bernstein, M.P., Dworkin, J.P., Sandford, S.A., Cooper, G.W., Allamandola, L.J., 2002. Racemic amino acids from the ultraviolet photolysis of interstellar ice analogues. *Nature* 416, 401–403. doi:10.1038/416401a
- Bibring, J.-P., Langevin, Y., 2006. L’histoire de Mars. *Images Phys.* 41–46.
- Bibring, J.-P., Langevin, Y., Gendrin, A., Gondet, B., Poulet, F., Berthé, M., Soufflot, A., Arvidson, R., Mangold, N., Mustard, J., Drossart, P., 2005. Mars Surface Diversity as Revealed by the OMEGA/Mars Express Observations. *Science* 307, 1576–1581. doi:10.1126/science.1108806
- Bibring, J.-P., Langevin, Y., Mustard, J.F., Poulet, F., Arvidson, R., Gendrin, A., Gondet, B., Mangold, N., Pinet, P., Forget, F., Berthé, M., Bibring, J.-P., Gendrin, A., Gomez, C., Gondet, B., Jouglet, D., Poulet, F., Soufflot, A., Vincendon, M., Combes, M., Drossart, P., Encrenaz, T., Fouchet, T., Mercurio, R., Belluci, G., Altieri, F., Formisano, V., Capaccioni, F., Ceroni, P., Coradini, A., Fonti, S., Korabely, O., Kottsov, V., Ignatiev, N., Moroz, V., Titov, D., Zasova, L., Loiseau, D., Mangold, N., Pinet, P., Douté, S., Schmitt, B., Sotin, C., Hauber, E., Hoffmann, H., Jaumann, R., Keller, U., Arvidson, R., Mustard, J.F., Duxbury, T., Forget, F., Neukum, G., 2006. Global Mineralogical and Aqueous Mars History Derived from OMEGA/Mars Express Data. *Science* 312, 400–404. doi:10.1126/science.1122659
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 336, 93–104. doi:10.1016/S0378-4347(00)85133-6
- Birgel, D., Himmeler, T., Freiwald, A., Peckmann, J., 2008. A new constraint on the antiquity of anaerobic oxidation of methane: Late Pennsylvanian seep limestones from southern Namibia. *Geology* 36, 543–546. doi:10.1130/G24690A.1

- Bishop, J.L., 2005. 4 Hydrated Minerals on Mars, in: Tokano, T. (Ed.), *Water on Mars and Life, Advances in Astrobiology and Biogeophysics*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 65–96.
- Bishop, J.L., Parente, M., Weitz, C.M., Noe Dobrea, E.Z., Roach, L.H., Murchie, S.L., McGuire, P.C., McKeown, N.K., Rossi, C.M., Brown, A.J., Calvin, W.M., Milliken, R., Mustard, J.F., 2009. Mineralogy of Juventae Chasma: Sulfates in the light-toned mounds, mafic minerals in the bedrock, and hydrated silica and hydroxylated ferric sulfate on the plateau. *J. Geophys. Res. Planets* 114, E00D09. doi:10.1029/2009JE003352
- Botta, O., Bada, J.L., 2002. Extraterrestrial Organic Compounds in Meteorites. *Surv. Geophys.* 23, 411–467. doi:10.1023/A:1020139302770
- Botta, O., Glavin, D.P., Kminek, G., Bada, J.L., 2002. Relative amino acid concentrations as a signature for parent body processes of carbonaceous chondrites. *Orig. Life Evol. Biospheres* 32, 143–163.
- Botta, O., Martins, Z., Ehrenfreund, P., 2007. Amino acids in Antarctic CM1 meteorites and their relationship to other carbonaceous chondrites. *Meteorit. Planet. Sci.* 42, 81–92.
- Boynton, W.V., Ming, D.W., Kounaves, S.P., Young, S.M.M., Arvidson, R.E., Hecht, M.H., Hoffman, J., Niles, P.B., Hamara, D.K., Quinn, R.C., Smith, P.H., Sutter, B., Catling, D.C., Morris, R.V., 2009. Evidence for Calcium Carbonate at the Mars Phoenix Landing Site. *Science* 325, 61–64. doi:10.1126/science.1172768
- Brack, A., Clancy, P., Fitton, B., Hofmann, B., Horneck, G., Kurat, G., Maxwell, J., Ori, G., Pillinger, C., Raulin, F., Thomas, N., Westall, F., 1999. An integrated exobiology package for the search for life on Mars. *Adv. Space Res.* 23, 301–308. doi:10.1016/S0273-1177(99)00051-4
- Brinton, K.L.F., Bada, J.L., 1996. A reexamination of amino acids in lunar soils: Implications for the survival of exogenous organic material during impact delivery. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 349–354. doi:10.1016/0016-7037(95)00404-1
- Brinton, K.L.F., Engrand, C., Glavin, D.P., Bada, J.L., Maurette, M., 1998. A search for extraterrestrial amino acids in carbonaceous Antarctic micrometeorites. *Orig. Life Evol. Biospheres* 28, 413–424.
- Buch, A., Glavin, D., Sternberg, R., Szopa, C., Rodier, C., Navarro-González, R., Raulin, F., Cabane, M., Mahaffy, P., 2006. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry. *Planet. Space Sci.* 54, 1592–1599.
- Buch, A., Sternberg, R., Meunier, D., Rodier, C., Laurent, C., Raulin, F., Vidal-Madjar, C., 2003. Solvent extraction of organic molecules of exobiological interest for in situ analysis of the Martian soil. *J. Chromatogr. A* 999, 165–174. doi:10.1016/S0021-9673(03)00494-1
- Buch, A., Sternberg, R., Szopa, C., Freissinet, C., Garnier, C., Bekri, E.J., Rodier, C., Navarro-González, R., Raulin, F., Cabane, M., others, 2009. Development of a gas chromatography compatible Sample Processing System (SPS) for the in-situ analysis of refractory organic matter in martian soil: preliminary results. *Adv. Space Res.* 43, 143–151.
- Buick, R., 2008. When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 2731–2743. doi:10.1098/rstb.2008.0041
- Burton, A.S., Elsila, J.E., Callahan, M.P., Martin, M.G., Glavin, D.P., Johnson, N.M., Dworkin, J.P., 2012a. A propensity for n- ω -amino acids in thermally altered Antarctic meteorites. *Meteorit. Planet. Sci.* 47, 374–386. doi:10.1111/j.1945-5100.2012.01341.x

- Burton, A.S., Stern, J.C., Elsila, J.E., Glavin, D.P., Dworkin, J.P., 2012b. Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites. *Chem. Soc. Rev.* 41, 5459–5472. doi:10.1039/C2CS35109A
- Caro, G.M.M., Meierhenrich, U., Schutte, W., Barbier, B., Segovia, A.A., Rosenbauer, H., Thiemann, W.H.P., Brack, A., Greenberg, J., 2002. Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Nature* 416, 403–406.
- Carrasco, N., Alcaraz, C., Dutuit, O., Plessis, S., Thissen, R., Vuitton, V., Yelle, R., Pernot, P., 2008. Sensitivity of a Titan ionospheric model to the ion-molecule reaction parameters. *Planet. Space Sci., Surfaces and Atmospheres of the Outer Planets, their Satellites and Ring Systems, Part IV* Meetings held in 2007: EGU: PS3.0 & PS3.1; IUGG/IAMAS:JMS12 & JMS13; AOGS: PS09 & PS11; EPSC2: AO4 or PM1 56, 1644–1657. doi:10.1016/j.pss.2008.04.007
- Carr, M.H., Head III, J.W., 2010. Geologic history of Mars. *Earth Planet. Sci. Lett.* 294, 185–203. doi:10.1016/j.epsl.2009.06.042
- Carter, J., Poulet, F., Bibring, J.-P., Murchie, S., 2010. Detection of Hydrated Silicates in Crustal Outcrops in the Northern Plains of Mars. *Science* 328, 1682–1686. doi:10.1126/science.1189013
- Catling, D.C., Claire, M.W., Zahnle, K.J., Quinn, R.C., Clark, B.C., Hecht, M.H., Kounaves, S., 2010. Atmospheric origins of perchlorate on Mars and in the Atacama. *J. Geophys. Res. Planets* 1991–2012 115.
- Chen, I.A., Roberts, R.W., Szostak, J.W., 2004. The emergence of competition between model protocells. *Science* 305, 1474–1476. doi:10.1126/science.1100757
- Chevrier, V., Mathé, P.E., 2007. Mineralogy and evolution of the surface of Mars: A review. *Planet. Space Sci.* 55, 289–314. doi:10.1016/j.pss.2006.05.039
- Christensen, P.R., Wyatt, M.B., Glotch, T.D., Rogers, A.D., Anwar, S., Arvidson, R.E., Bandfield, J.L., Blaney, D.L., Budney, C., Calvin, W.M., Fallacaro, A., Fergason, R.L., Gorelick, N., Graff, T.G., Hamilton, V.E., Hayes, A.G., Johnson, J.R., Knudson, A.T., McSween, H.Y., Mehall, G.L., Mehall, L.K., Moersch, J.E., Morris, R.V., Smith, M.D., Squyres, S.W., Ruff, S.W., Wolff, M.J., 2004. Mineralogy at Meridiani Planum from the Mini-TES Experiment on the Opportunity Rover. *Science* 306, 1733–1739. doi:10.1126/science.1104909
- Chyba, C.F., Phillips, C.B., 2001. Possible ecosystems and the search for life on Europa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 801–804. doi:10.1073/pnas.98.3.801
- Chyba, C., Sagan, C., 1992. Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life. *Nature* 355, 125–132. doi:10.1038/355125a0
- Claeys, P., Morbidelli, A., 2011. Late Heavy Bombardment, in: Gargaud, M., Amils, P.R., Quintanilla, J.C., II, H.J. (Jim) C., Irvine, W.M., Pinti, P.D.L., Viso, M. (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 909–912.
- Clancy, R.T., Sandor, B.J., Moriarty-Schieven, G.H., 2004. A measurement of the 362 GHz absorption line of Mars atmospheric H₂O₂. *Icarus* 168, 116–121. doi:10.1016/j.icarus.2003.12.003
- Cleaves, H.J., Chalmers, J.H., Lazcano, A., Miller, S.L., Bada, J.L., 2008. A Reassessment of Prebiotic Organic Synthesis in Neutral Planetary Atmospheres. *Orig. Life Evol. Biospheres* 38, 105–115. doi:10.1007/s11084-007-9120-3
- Clemett, S.J., Chillier, X.D.F., Gillette, S., Zare, R.N., Maurette, M., Engrand, C., Kurat, G., 1998. Observation of Indigenous Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in “Giant”

- carbonaceous Antarctic Micrometeorites. *Orig. Life Evol. Biosph.* 28, 425–448.
doi:10.1023/A:1006572307223
- Cooper, G., Cronin, J., 1995. Linear and Cyclic Aliphatic Carboxamides of the Murchison Meteorite - Hydrolyzable Derivatives of Amino-Acids and Other Carboxylic-Acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1003–1015. doi:10.1016/0016-7037(95)00018-6
- Cooper, G., Kimmich, N., Belisle, W., Sarinana, J., Brabham, K., Garrel, L., 2001. Carbonaceous meteorites as a source of sugar-related organic compounds for the early Earth. *Nature* 414, 879–883. doi:10.1038/414879a
- Corfield, M., Robson, A., 1953. The amino acid composition of salmine. *Biochem. J.* 55, 517.
- Cronin, J.R., Gandy, W.E., Pizzarello, S., 1981. Amino acids of the murchison meteorite: J. *Mol. Evol.* 17, 265–272. doi:10.1007/BF01795748
- Cronin, J.R., Pizzarello, S., 1997. Enantiomeric Excesses in Meteoritic Amino Acids. *Science* 275, 951–955. doi:10.1126/science.275.5302.951
- Crowe, S.A., Døssing, L.N., Beukes, N.J., Bau, M., Kruger, S.J., Frei, R., Canfield, D.E., 2013. Atmospheric oxygenation three billion years ago. *Nature* 501, 535–538. doi:10.1038/nature12426
- Cruikshank, D.P., Wegrzyn, E., Dalle Ore, C.M., Brown, R.H., Bibring, J.-P., Buratti, B.J., Clark, R.N., McCord, T.B., Nicholson, P.D., Pendleton, Y.J., Owen, T.C., Filacchione, G., Coradini, A., Cerroni, P., Capaccioni, F., Jaumann, R., Nelson, R.M., Baines, K.H., Sotin, C., Bellucci, G., Combes, M., Langevin, Y., Sicardy, B., Matson, D.L., Formisano, V., Drossart, P., Mennella, V., 2008. Hydrocarbons on Saturn's satellites Iapetus and Phoebe. *Icarus* 193, 334–343. doi:10.1016/j.icarus.2007.04.036
- Dalrymple, G.B., 2001. The age of the Earth in the twentieth century: a problem (mostly) solved. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.* 190, 205–221. doi:10.1144/GSL.SP.2001.190.01.14
- Darragh, A.J., Garrick, D.J., Moughan, P.J., Hendriks, W.H., 1996. Correction for Amino Acid Loss during Acid Hydrolysis of a Purified Protein. *Anal. Biochem.* 236, 199–207. doi:10.1006/abio.1996.0157
- Des Marais, D.J., Harwit, M.O., Jucks, K.W., Kasting, J.F., Lin, D.N.C., Lunine, J.I., Schneider, J., Seager, S., Traub, W.A., Woolf, N.J., 2002. Remote Sensing of Planetary Properties and Biosignatures on Extrasolar Terrestrial Planets. *Astrobiology* 2, 153–181. doi:10.1089/15311070260192246
- Despois, D., Cottin, H., 2005. Comets: Potential Sources of Prebiotic Molecules for the Early Earth, in: Gargaud, M., Barbier, B., Martin, H., Risse, J. (Eds.), *Lectures in Astrobiology, Advances in Astrobiology and Biogeophysics*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 289–352.
- Di Achille, G., Hynek, B.M., 2010. Ancient ocean on Mars supported by global distribution of deltas and valleys. *Nat. Geosci.* 3, 459–463. doi:10.1038/ngeo891
- Ehlmann, B.L., Berger, G., Mangold, N., Michalski, J.R., Catling, D.C., Ruff, S.W., Chassefière, E., Niles, P.B., Chevrier, V., Poulet, F., 2013. Geochemical Consequences of Widespread Clay Mineral Formation in Mars' Ancient Crust. *Space Sci. Rev.* 174, 329–364. doi:10.1007/s11214-012-9930-0
- Ehlmann, B.L., Mustard, J.F., Murchie, S.L., Bibring, J.-P., Meunier, A., Fraeman, A.A., Langevin, Y., 2011. Subsurface water and clay mineral formation during the early history of Mars. *Nature* 479, 53–60. doi:10.1038/nature10582
- Ehlmann, B.L., Mustard, J.F., Murchie, S.L., Poulet, F., Bishop, J.L., Brown, A.J., Calvin, W.M., Clark, R.N., Marais, D.J.D., Milliken, R.E., Roach, L.H., Roush, T.L., Swayze, G.A., Wray,

- J.J., 2008. Orbital Identification of Carbonate-Bearing Rocks on Mars. *Science* 322, 1828–1832. doi:10.1126/science.1164759
- Ehrenfreund, P., Charnley, S.B., 2000. ORGANIC MOLECULES IN THE INTERSTELLAR MEDIUM, COMETS, AND METEORITES: A Voyage from Dark Clouds to the Early Earth. *Annu. Rev. Astron. Astrophys.* 38, 427–483. doi:10.1146/annurev.astro.38.1.427
- Ehrenfreund, P., Glavin, D.P., Botta, O., Cooper, G., Bada, J.L., 2001. Extraterrestrial amino acids in Orgueil and Ivuna: Tracing the parent body of CI type carbonaceous chondrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2138.
- Ehrenfreund, P., Robert, F., d'Hendecourt, L., Behar, F., 1991. Comparison of interstellar and meteoritic organic matter at 3.4 microns. *Astron. Astrophys.* 252, 712–717.
- Elsila, J.E., Glavin, D.P., Dworkin, J.P., 2009. Cometary glycine detected in samples returned by Stardust. *Meteorit. Planet. Sci.* 44, 1323–1330. doi:10.1111/j.1945-5100.2009.tb01224.x
- Encrenaz, T., 2001. The Atmosphere of Mars as Constrained by Remote Sensing. *Space Sci. Rev.* 96, 411–424. doi:10.1023/A:1011922011532
- Encrenaz, T., Bézard, B., Greathouse, T.K., Richter, M.J., Lacy, J.H., Atreya, S.K., Wong, A.S., Lebonnois, S., Lefèvre, F., Forget, F., 2004a. Hydrogen peroxide on Mars: evidence for spatial and seasonal variations. *Icarus* 170, 424–429. doi:10.1016/j.icarus.2004.05.008
- Encrenaz, T., Lellouch, E., Atreya, S.K., Wong, A.S., 2004b. Detectability of minor constituents in the martian atmosphere by infrared and submillimeter spectroscopy. *Planet. Space Sci., Planet Mars. Sponsors: Centre National d'Etudes Spatiales (CNES); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Observatoire de Paris* 52, 1023–1037. doi:10.1016/j.pss.2004.07.011
- Engel, M.H., Macko, S.A., 1997. Isotopic evidence for extraterrestrial non- racemic amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* 389, 265–268. doi:10.1038/38460
- Fletcher, J., 2015. NASA Astrobiology: Life in the Universe 2nd Announcement for the Workshop on the Potential for Finding Life in a Europa Plume [WWW Document]. URL <https://astrobiology.nasa.gov/articles/2015/1/7/2nd-announcement-for-the-workshop-on-the-potential-for-finding-life-in-a-europa-plume/> (accessed 11.21.15).
- Fonti, S., Marzo, G.A., 2010. Mapping the methane on Mars. *Astron. Astrophys.* 512, A51. doi:10.1051/0004-6361/200913178
- Formisano, V., Atreya, S., Encrenaz, T., Ignatiev, N., Giuranna, M., 2004. Detection of Methane in the Atmosphere of Mars. *Science* 306, 1758–1761. doi:10.1126/science.1101732
- Fortes, A.D., 2000. Exobiological Implications of a Possible Ammonia–Water Ocean inside Titan. *Icarus* 146, 444–452. doi:10.1006/icar.2000.6400
- Fountoulakis, M., Lahm, H.W., 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J. Chromatogr. A* 826, 109–134.
- Fox, S.W., Harada, K., Hare, P.E., Hinsch, G., Mueller, G., 1970. Bio-organic Compounds and Glassy Microparticles in Lunar Fines and Other Materials. *Science* 167, 767 –770. doi:10.1126/science.167.3918.767
- Freissinet, C., Buch, A., Sternberg, R., Szopa, C., Geffroy-Rodier, C., Jelinek, C., Stambouli, M., 2010. Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 731–740. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.009

- Fulchignoni, M., Ferri, F., Angrilli, F., Ball, A.J., Bar-Nun, A., Barucci, M.A., Bettanini, C., Bianchini, G., Borucki, W., Colombatti, G., Coradini, M., Coustenis, A., Debei, S., Falkner, P., Fanti, G., Flamini, E., Gaborit, V., Grard, R., Hamelin, M., Harri, A.M., Hathi, B., Jernej, I., Leese, M.R., Lehto, A., Lion Stoppato, P.F., López-Moreno, J.J., Mäkinen, T., McDonnell, J. a. M., McKay, C.P., Molina-Cuberos, G., Neubauer, F.M., Pirronello, V., Rodrigo, R., Saggin, B., Schwingenschuh, K., Seiff, A., Simões, F., Svedhem, H., Tokano, T., Towner, M.C., Trautner, R., Withers, P., Zarnecki, J.C., 2005. In situ measurements of the physical characteristics of Titan's environment. *Nature* 438, 785–791. doi:10.1038/nature04314
- Geffroy-Rodier, C., Grasset, L., Sternberg, R., Buch, A., Amblès, A., 2009. Thermochemolysis in search for organics in extraterrestrial environments. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 85, 454–459. doi:10.1016/j.jaap.2008.10.005
- Gelman, B.G., Zolotukhin, V.G., Lamonov, N.I., Levchuk, B.V., Lipatov, A.N., Mukhin, L.M., Nenarokov, D.F., Rotin, V.A., Okhotnikov, B.P., 1980. Analysis of chemical composition of Venus atmosphere by gas chromatograph on Venera 12. *Cosm. Res.* 17, 585–589.
- Geminale, A., Formisano, V., Sindoni, G., 2011. Mapping methane in Martian atmosphere with PFS-MEX data. *Planet. Space Sci.* 59, 137–148. doi:10.1016/j.pss.2010.07.011
- Gendrin, A., Mangold, N., Bibring, J.-P., Langevin, Y., Gondet, B., Poulet, F., Bonello, G., Quantin, C., Mustard, J., Arvidson, R., LeMouélic, S., 2005. Sulfates in Martian Layered Terrains: The OMEGA/Mars Express View. *Science* 307, 1587–1591. doi:10.1126/science.1109087
- Gilbert, W., 1986. Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618–618. doi:10.1038/319618a0
- Glavin, D., Bada, J., Brinton, K., McDonald, G., 1999. Amino acids in the Martian meteorite Nakhla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8835–8838. doi:10.1073/pnas.96.16.8835
- Glavin, D., Matrajt, G., Bada, J., 2004. Re-examination of amino acids in Antarctic micrometeorites. *Adv. Space Res.* 33, 106–113.
- Glavin, D.P., Callahan, M.P., Dworkin, J.P., Elsila, J.E., 2010. The effects of parent body processes on amino acids in carbonaceous chondrites. *Meteorit. Planet. Sci.* 45, 1948–1972. doi:10.1111/j.1945-5100.2010.01132.x
- Glavin, D.P., Cleaves, H.J., Buch, A., Schubert, M., Aubrey, A., Bada, J.L., Mahaffy, P.R., 2006. Sublimation extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry: A new technique for future in situ analyses of purines and pyrimidines on Mars. *Planet. Space Sci.* 54, 1584–1591. doi:10.1016/j.pss.2005.12.023
- Glavin, D.P., Dworkin, J.P., 2009. Enrichment of the amino acid L-isovaline by aqueous alteration on CI and CM meteorite parent bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5487–5492. doi:10.1073/pnas.0811618106
- Glavin, D.P., Freissinet, C., Miller, K.E., Eigenbrode, J.L., Brunner, A.E., Buch, A., Sutter, B., Archer, P.D., Atreya, S.K., Brinckerhoff, W.B., Cabane, M., Coll, P., Conrad, P.G., Coscia, D., Dworkin, J.P., Franz, H.B., Grotzinger, J.P., Leshin, L.A., Martin, M.G., McKay, C., Ming, D.W., Navarro-González, R., Pavlov, A., Steele, A., Summons, R.E., Szopa, C., Teinturier, S., Mahaffy, P.R., 2013. Evidence for perchlorates and the origin of chlorinated hydrocarbons detected by SAM at the Rocknest aeolian deposit in Gale Crater. *J. Geophys. Res. Planets* 118, 1955–1973. doi:10.1002/jgre.20144
- Goesmann, F., Rosenbauer, H., Bredehöft, J.H., Cabane, M., Ehrenfreund, P., Gautier, T., Giri, C., Krüger, H., Roy, L.L., MacDermott, A.J., McKenna-Lawlor, S., Meierhenrich, U.J., Caro, G.M.M., Raulin, F., Roll, R., Steele, A., Steininger, H., Sternberg, R., Szopa, C.,

- Thiemann, W., Ulamec, S., 2015. Organic compounds on comet 67P/Churyumov-Gerasimenko revealed by COSAC mass spectrometry. *Science* 349, aab0689. doi:10.1126/science.aab0689
- Goesmann, F., Rosenbauer, H., Roll, R., Bönnhardt, H., 2005. COSAC Onboard Rosetta: A Bioastronomy Experiment for the Short-Period Comet 67P/Churyumov-Gerasimenko. *Astrobiology* 5, 622–631. doi:10.1089/ast.2005.5.622
- Greenberg, J.M., 1982. What are comets made of? A model based on interstellar dust. *Comets* 131, 163.
- Griffith, E.C., Vaida, V., 2012. In situ observation of peptide bond formation at the water–air interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 15697–15701. doi:10.1073/pnas.1210029109
- Grotzinger, J.P., 2014. Habitability, Taphonomy, and the Search for Organic Carbon on Mars. *Science* 343, 386–387. doi:10.1126/science.1249944
- Grotzinger, J.P., Sumner, D.Y., Kah, L.C., Stack, K., Gupta, S., Edgar, L., Rubin, D., Lewis, K., Schieber, J., Mangold, N., Milliken, R., Conrad, P.G., DesMarais, D., Farmer, J., Siebach, K., Calef, F., Hurowitz, J., McLennan, S.M., Ming, D., Vaniman, D., Crisp, J., Vasavada, A., Edgett, K.S., Malin, M., Blake, D., Gellert, R., Mahaffy, P., Wiens, R.C., Maurice, S., Grant, J.A., Wilson, S., Anderson, R.C., Beegle, L., Arvidson, R., Hallet, B., Sletten, R.S., Rice, M., Bell, J., Griffes, J., Ehlmann, B., Anderson, R.B., Bristow, T.F., Dietrich, W.E., Dromart, G., Eigenbrode, J., Fraeman, A., Hardgrove, C., Herkenhoff, K., Jandura, L., Kocurek, G., Lee, S., Leshin, L.A., Leveille, R., Limonadi, D., Maki, J., McCloskey, S., Meyer, M., Minitti, M., Newsom, H., Oehler, D., Okon, A., Palucis, M., Parker, T., Rowland, S., Schmidt, M., Squyres, S., Steele, A., Stolper, E., Summons, R., Treiman, A., Williams, R., Yingst, A., MSL Science Team, 2014. A Habitable Fluvio-Lacustrine Environment at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. *Science* 343, 1242777. doi:10.1126/science.1242777
- Gudipati, M.S., Yang, R., 2012. In-situ Probing of Radiation-induced Processing of Organics in Astrophysical Ice Analogs—Novel Laser Desorption Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectroscopic Studies. *Astrophys. J. Lett.* 756, L24. doi:10.1088/2041-8205/756/1/L24
- Hamilton, P.B., Nagy, B., 1972. Problems in the search for amino acids in lunar fines. *Space Life Sci.* 3, 432–438. doi:10.1007/BF00926772
- Hanczyc, M.M., Fujikawa, S.M., Szostak, J.W., 2003. Experimental Models of Primitive Cellular Compartments: Encapsulation, Growth, and Division. *Science* 302, 618–622. doi:10.1126/science.1089904
- Hanczyc, M.M., Szostak, J.W., 2004. Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 660–664. doi:10.1016/j.cbpa.2004.10.002
- Hare, P.E., Harada, K., Fox, S.W., 1970. Analyses for amino acids in lunar fines. *Geochim. Cosmochim. Acta Suppl.* 1, 1799.
- Hecht, M.H., Kounaves, S.P., Quinn, R.C., West, S.J., Young, S.M.M., Ming, D.W., Catling, D.C., Clark, B.C., Boynton, W.V., Hoffman, J., DeFlores, L.P., Gospodinova, K., Kapit, J., Smith, P.H., 2009. Detection of Perchlorate and the Soluble Chemistry of Martian Soil at the Phoenix Lander Site. *Science* 325, 64–67. doi:10.1126/science.1172466
- Heinrikson, R.L., Meredith, S.C., 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136, 65–74.
- Hirs, C.H.W., Stein, W.H., Moore, S., others, 1954. The amino acid composition of ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 211, 941.

- Holland, H.D., 2002. Volcanic gases, black smokers, and the great oxidation event. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 3811–3826. doi:10.1016/S0016-7037(02)00950-X
- Hollis, J.M., Lovas, F.J., Jewell, P.R., 2000. Interstellar Glycolaldehyde: The First Sugar. *Astrophys. J. Lett.* 540, L107. doi:10.1086/312881
- Iess, L., Jacobson, R.A., Ducci, M., Stevenson, D.J., Lunine, J.I., Armstrong, J.W., Asmar, S.W., Racioppa, P., Rappaport, N.J., Tortora, P., 2012. The Tides of Titan. *Science* 337, 457–459. doi:10.1126/science.1219631
- Irvine, W.M., Schloerb, F.P., Crovisier, J., Fegley Jr, B., Mumma, M.J., 2000. Comets: A link between interstellar and nebular chemistry. *Protostars Planets IV* 1159.
- Jakosky, B.M., Mellon, M.T., 2004. Water on Mars. *Phys. Today* 57, 71–76.
- Johnson, A.P., Cleaves, H.J., Dworkin, J.P., Glavin, D.P., Lazcano, A., Bada, J.L., 2008. The Miller Volcanic Spark Discharge Experiment. *Science* 322, 404–404. doi:10.1126/science.1161527
- Jørgensen, J.K., Favre, C., Bisschop, S.E., Bourke, T.L., Dishoeck, E.F. van, Schmalzl, M., 2012. Detection of the Simplest Sugar, Glycolaldehyde, in a Solar-type Protostar with ALMA. *Astrophys. J. Lett.* 757, L4. doi:10.1088/2041-8205/757/1/L4
- Kane, S.R., Gelino, D.M., 2012. The habitable zone and extreme planetary orbits. *Astrobiology* 12, 940–945.
- Karas, M., Bahr, U., 1986. Laser desorption mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* 5, 90–93. doi:10.1016/0165-9936(86)80048-6
- Kargel, J.S., 1991. Brine volcanism and the interior structures of asteroids and icy satellites. *Icarus* 94, 368–390. doi:10.1016/0019-1035(91)90235-L
- Keil, R.G., Kirchman, D.L., 1991. Dissolved combined amino acids in marine waters as determined by a vapor-phase hydrolysis method. *Mar. Chem.* 33, 243–259.
- Kissel, J., Brownlee, D.E., Büchler, K., Clark, B.C., Fechtig, H., Grün, E., Hornung, K., Igenbergs, E.B., Jessberger, E.K., Krueger, F.R., Kucsera, H., McDonnell, J. a. M., Morfill, G.M., Rahe, J., Schwehm, G.H., Sekanina, Z., Utterback, N.G., Völk, H.J., Zook, H.A., 1986a. Composition of comet Halley dust particles from Giotto observations. *Nature* 321, 336–337. doi:10.1038/321336a0
- Kissel, J., Krueger, F.R., 1987. The organic component in dust from comet Halley as measured by the PUMA mass spectrometer on board Vega 1. *Nature* 326, 755–760. doi:10.1038/326755a0
- Kissel, J., Sagdeev, R.Z., Bertaux, J.L., Angarov, V.N., Audouze, J., Blamont, J.E., Büchler, K., Evlanov, E.N., Fechtig, H., Fomenkova, M.N., von Hoerner, H., Inogamov, N.A., Khromov, V.N., Knabe, W., Krueger, F.R., Langevin, Y., Leonas, V.B., Levasseur-Regourd, A.C., Managadze, G.G., Podkolzin, S.N., Shapiro, V.D., Tabaldyev, S.R., Zubkov, B.V., 1986b. Composition of comet Halley dust particles from Vega observations. *Nature* 321, 280–282. doi:10.1038/321280a0
- Kivelson, M.G., Khurana, K.K., Russell, C.T., Volwerk, M., Walker, R.J., Zimmer, C., 2000. Galileo Magnetometer Measurements: A Stronger Case for a Subsurface Ocean at Europa. *Science* 289, 1340–1343. doi:10.1126/science.289.5483.1340
- Kivelson, M.G., Khurana, K.K., Volwerk, M., 2002. The Permanent and Inductive Magnetic Moments of Ganymede. *Icarus* 157, 507–522. doi:10.1006/icar.2002.6834
- Klingelhöfer, G., Morris, R.V., Bernhardt, B., Schröder, C., Rodionov, D.S., Souza, P.A. de, Yen, A., Gellert, R., Evlanov, E.N., Zubkov, B., Foh, J., Bonnes, U., Kankeleit, E., Güttlich, P., Ming, D.W., Renz, F., Wdowiak, T., Squyres, S.W., Arvidson, R.E., 2004. Jarosite and

- Hematite at Meridiani Planum from Opportunity's Mössbauer Spectrometer. *Science* 306, 1740–1745. doi:10.1126/science.1104653
- Kminek, G., Bada, J.L., 2006. The effect of ionizing radiation on the preservation of amino acids on Mars. *Earth Planet. Sci. Lett.* 245, 1–5. doi:10.1016/j.epsl.2006.03.008
- Knapp, D.R., 1979. Handbook of analytical derivatization reactions. Wiley. com.
- Knecht, R., Chang, J.Y., 1986. Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (dimethylamino)azobenzenesulfonyl chloride. *Anal. Chem.* 58, 2375–2379. doi:10.1021/ac00125a006
- Koshland Jr., D.E., 2002. SPECIAL ESSAY: The Seven Pillars of Life. *Science* 295, 2215–2216. doi:10.1126/science.1068489
- Krasnopolsky, V.A., 2012. Search for methane and upper limits to ethane and SO₂ on Mars. *Icarus* 217, 144–152. doi:10.1016/j.icarus.2011.10.019
- Krasnopolsky, V.A., 2011. A Sensitive Search for Methane and Ethane on Mars, in: EPSC-DPS Joint Meeting 2011. Presented at the EPSC-DPS Joint Meeting 2011, p. 49.
- Krueger, F.R., Kissel, J., 1987. The chemical composition of the dust of comet P/Halley as measured by "PUMA" on board VEGA-1. *Naturwissenschaften* 74, 312–316. doi:10.1007/BF00367925
- Kuan, Y.-J., Charnley, S.B., Huang, H.-C., Tseng, W.-L., Kisiel, Z., 2003a. Interstellar Glycine. *Astrophys. J.* 593, 848. doi:10.1086/375637
- Kuan, Y.-J., Yan, C.-H., Charnley, S.B., Kisiel, Z., Ehrenfreund, P., Huang, H.-C., 2003b. A search for interstellar pyrimidine. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 345, 650–656. doi:10.1046/j.1365-8711.2003.06975.x
- Kun, A., Santos, M., Szathmáry, E., 2005. Real ribozymes suggest a relaxed error threshold. *Nat. Genet.* 37, 1008–1011. doi:10.1038/ng1621
- Kvenvolden, K.A., Lawless, J.G., Ponnamperna, C., 1971. Nonprotein Amino Acids in the Murchison Meteorite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 486–490.
- Kvenvolden, K., Lawless, J., Perring, K., Peterson, E., Flores, J., Ponnamperna, C., Kaplan, I., Moore, C., others, 1970. Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* 228, 923.
- Kwok, S., 2009. Organic matter in space: from star dust to the Solar System. *Astrophys. Space Sci.* 319, 5–21. doi:10.1007/s10509-008-9965-6
- Kwok, S., Zhang, Y., 2011. Mixed aromatic-aliphatic organic nanoparticles as carriers of unidentified infrared emission features. *Nature* 479, 80–83. doi:10.1038/nature10542
- Lal, A.K., 2008. Origin of Life. *Astrophys. Space Sci.* 317, 267–278. doi:10.1007/s10509-008-9876-6
- Langevin, Y., Poulet, F., Bibring, J.-P., Gondet, B., 2005a. Sulfates in the North Polar Region of Mars Detected by OMEGA/Mars Express. *Science* 307, 1584–1586. doi:10.1126/science.1109091
- Langevin, Y., Poulet, F., Bibring, J.-P., Schmitt, B., Douté, S., Gondet, B., 2005b. Summer Evolution of the North Polar Cap of Mars as Observed by OMEGA/Mars Express. *Science* 307, 1581–1584. doi:10.1126/science.1109438
- Leshin, L.A., Mahaffy, P.R., Webster, C.R., Cabane, M., Coll, P., Conrad, P.G., Archer, P.D., Atreya, S.K., Brunner, A.E., Buch, A., Eigenbrode, J.L., Flesch, G.J., Franz, H.B., Freissinet, C., Glavin, D.P., McAdam, A.C., Miller, K.E., Ming, D.W., Morris, R.V., Navarro-González, R., Niles, P.B., Owen, T., Pepin, R.O., Squyres, S., Steele, A., Stern, J.C., Summons, R.E., Sumner, D.Y., Sutter, B., Szopa, C., Teinturier, S., Trainer, M.G.,

- Wray, J.J., Grotzinger, J.P., MSL Science Team, 2013. Volatile, Isotope, and Organic Analysis of Martian Fines with the Mars Curiosity Rover. *Science* 341, 1238937. doi:10.1126/science.1238937
- Light, A., Smith, E.L., 1963. Amino acid analysis of peptides and proteins. *Proteins Compos. Struct. Funct.* 1, 1–44.
- López-Puertas, M., Dinelli, B.M., Adriani, A., Funke, B., García-Comas, M., Moriconi, M.L., D’Aversa, E., C. Boersma, Allamandola, L.J., 2013. Large Abundances of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Titan’s Upper Atmosphere. *Astrophys. J.* 770, 132. doi:10.1088/0004-637X/770/2/132
- Mahaffy, P.R., Webster, C.R., Atreya, S.K., Franz, H., Wong, M., Conrad, P.G., Harpold, D., Jones, J.J., Leshin, L.A., Manning, H., Owen, T., Pepin, R.O., Squyres, S., Trainer, M., MSL Science Team, 2013. Abundance and Isotopic Composition of Gases in the Martian Atmosphere from the Curiosity Rover. *Science* 341, 263–266. doi:10.1126/science.1237966
- Mahaffy, P.R., Webster, C.R., Cabane, M., Conrad, P.G., Coll, P., Atreya, S.K., Arvey, R., Barciniak, M., Benna, M., Bleacher, L., Brinckerhoff, W.B., Eigenbrode, J.L., Carignan, D., Cascia, M., Chalmers, R.A., Dworkin, J.P., Errigo, T., Everson, P., Franz, H., Farley, R., Feng, S., Frazier, G., Freissinet, C., Glavin, D.P., Harpold, D.N., Hawk, D., Holmes, V., Johnson, C.S., Jones, A., Jordan, P., Kellogg, J., Lewis, J., Lyness, E., Malespin, C.A., Martin, D.K., Maurer, J., McAdam, A.C., McLennan, D., Nolan, T.J., Noriega, M., Pavlov, A.A., Prats, B., Raaen, E., Sheinman, O., Sheppard, D., Smith, J., Stern, J.C., Tan, F., Trainer, M., Ming, D.W., Morris, R.V., Jones, J., Gundersen, C., Steele, A., Wray, J., Botta, O., Leshin, L.A., Owen, T., Battel, S., Jakosky, B.M., Manning, H., Squyres, S., Navarro-González, R., McKay, C.P., Raulin, F., Sternberg, R., Buch, A., Sorensen, P., Kline-Schoder, R., Coscia, D., Szopa, C., Teinturier, S., Baffes, C., Feldman, J., Flesch, G., Forouhar, S., Garcia, R., Keymeulen, D., Woodward, S., Block, B.P., Arnett, K., Miller, R., Edmonson, C., Gorevan, S., Mumm, E., 2012. The Sample Analysis at Mars Investigation and Instrument Suite. *Space Sci. Rev.* 170, 401–478. doi:10.1007/s11214-012-9879-z
- Malmberg, C., Maryott, A., 1956. Dielectric Constant of Water from 0-Degrees-C to 100-Degrees-C. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* 56, 1–8. doi:10.6028/jres.056.001
- Mancinelli, R.L., 2000. Accessing the Martian deep subsurface to search for life. *Planet. Space Sci.* 48, 1035–1042. doi:10.1016/S0032-0633(00)00077-5
- Marlow, J.J., Martins, Z., Sephton, M.A., 2008. Mars on Earth: soil analogues for future Mars missions. *Astron. Geophys.* 49, 2.20–2.23. doi:10.1111/j.1468-4004.2008.49220.x
- Martins, Z., 2011. In situ biomarkers and the Life Marker Chip. *Astron. Geophys.* 52, 1–34.
- Martins, Z., Alexander, C.M.O.D., Orzechowska, G., Fogel, M., Ehrenfreund, P., 2007. Indigenous amino acids in primitive CR meteorites. *Meteorit. Planet. Sci.* 42, 2125–2136.
- Martins, Z., Botta, O., Fogel, M.L., Sephton, M.A., Glavin, D.P., Watson, J.S., Dworkin, J.P., Schwartz, A.W., Ehrenfreund, P., 2008. Extraterrestrial nucleobases in the Murchison meteorite. *Earth Planet. Sci. Lett.* 270, 130–136. doi:10.1016/j.epsl.2008.03.026
- Martins, Z., Price, M.C., Goldman, N., Sephton, M.A., Burchell, M.J., 2013. Shock synthesis of amino acids from impacting cometary and icy planet surface analogues. *Nat. Geosci.* advance online publication. doi:10.1038/ngeo1930

- Martins, Z., Sephton, M. a., Foing, B. h., Ehrenfreund, P., 2011. Extraction of Amino Acids from Soils Close to the Mars Desert Research Station (MDRS), Utah. *Int. J. Astrobiol.* 10, 231–238. doi:10.1017/S1473550410000431
- Martín-Torres, F.J., Zorzano, M.-P., Valentín-Serrano, P., Harri, A.-M., Genzer, M., Kemppinen, O., Rivera-Valentin, E.G., Jun, I., Wray, J., Bo Madsen, M., Goetz, W., McEwen, A.S., Hardgrove, C., Renno, N., Chevrier, V.F., Mischna, M., Navarro-González, R., Martínez-Frías, J., Conrad, P., McConnochie, T., Cockell, C., Berger, G., R. Vasavada, A., Sumner, D., Vaniman, D., 2015. Transient liquid water and water activity at Gale crater on Mars. *Nat. Geosci.* 8, 357–361. doi:10.1038/ngeo2412
- Maurette, M., 1998. Carbonaceous Micrometeorites and the Origin of Life. *Orig. Life Evol. Biosph.* 28, 385–412. doi:10.1023/A:1006589819844
- Maurette, M., Duprat, J., Engrand, C., Gounelle, M., Kurat, G., Matrajt, G., Toppani, A., 2000. Accretion of neon, organics, CO₂, nitrogen and water from large interplanetary dust particles on the early Earth. *Planet. Space Sci.* 48, 1117–1137. doi:10.1016/S0032-0633(00)00086-6
- Mawhinney, T.P., Madson, M.A., 1982. N-Methyl-N-(tert-butyl dimethylsilyl)trifluoroacetamide and related N-tert-butyl dimethylsilyl amides as protective silyl donors. *J. Org. Chem.* 47, 3336–3339. doi:10.1021/jo00138a032
- McKay, C.P., 1991. Urey prize lecture: Planetary evolution and the origin of life. *Icarus* 91, 93–100. doi:10.1016/0019-1035(91)90128-G
- McKay, C.P., Smith, H.D., 2005. Possibilities for methanogenic life in liquid methane on the surface of Titan. *Icarus* 178, 274–276. doi:10.1016/j.icarus.2005.05.018
- McKay, D.S., Gibson, E.K., Thomas-Keprta, K.L., Vali, H., Romanek, C.S., Clemett, S.J., Chillier, X.D.F., Maechling, C.R., Zare, R.N., 1996. Search for Past Life on Mars: Possible Relic Biogenic Activity in Martian Meteorite ALH84001. *Science* 273, 924–930. doi:10.1126/science.273.5277.924
- McLennan, S.M., Anderson, R.B., Bell III, J.F., Bridges, J.C., Calef, F., Campbell, J.L., Clark, B.C., Clegg, S., Conrad, P., Cousin, A., Des Marais, D.J., Dromart, G., Dyar, M.D., Edgar, L.A., Ehlmann, B.L., Fabre, C., Forni, O., Gasnault, O., Gellert, R., Gordon, S., Grant, J.A., Grotzinger, J.P., Gupta, S., Herkenhoff, K.E., Hurowitz, J.A., King, P.L., Le Mouélic, S., Leshin, L.A., Léveillé, R., Lewis, K.W., Mangold, N., Maurice, S., Ming, D.W., Morris, R.V., Nachon, M., Newsom, H.E., Ollila, A.M., Perrett, G.M., Rice, M.S., Schmidt, M.E., Schwenzer, S.P., Stack, K., Stolper, E.M., Sumner, D.Y., Treiman, A.H., VanBommel, S., Vaniman, D.T., Vasavada, A., Wiens, R.C., Yingst, R.A., MSL Science Team, 2014. Elemental Geochemistry of Sedimentary Rocks at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. *Science* 343, 1244734. doi:10.1126/science.1244734
- Meierhenrich, U.J., Muñoz Caro, G.M., Bredehöft, J.H., Jessberger, E.K., Thiemann, W.H.P., 2004. Identification of diamino acids in the Murchison meteorite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9182.
- Meierhenrich, U.J., Muñoz Caro, G.M., Schutte, W.A., Thiemann, W.H.-P., Barbier, B., Brack, A., 2005. Precursors of Biological Cofactors from Ultraviolet Irradiation of Circumstellar/Interstellar Ice Analogues. *Chem. – Eur. J.* 11, 4895–4900. doi:10.1002/chem.200500074
- Miller, S.L., 1953. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117, 528–529.
- Milliken, R.E., Swayze, G.A., Arvidson, R.E., Bishop, J.L., Clark, R.N., Ehlmann, B.L., Green, R.O., Grotzinger, J.P., Morris, R.V., Murchie, S.L., Mustard, J.F., Weitz, C., 2008.

- Opaline silica in young deposits on Mars. *Geology* 36, 847–850.
doi:10.1130/G24967A.1
- Ming, D.W., Archer, P.D., Glavin, D.P., Eigenbrode, J.L., Franz, H.B., Sutter, B., Brunner, A.E., Stern, J.C., Freissinet, C., McAdam, A.C., Mahaffy, P.R., Cabane, M., Coll, P., Campbell, J.L., Atreya, S.K., Niles, P.B., Bell III, J.F., Bish, D.L., Brinckerhoff, W.B., Buch, A., Conrad, P.G., Des Marais, D.J., Ehlmann, B.L., Fairén, A.G., Farley, K., Flesch, G.J., Francois, P., Gellert, R., Grant, J.A., Grotzinger, J.P., Gupta, S., Herkenhoff, K.E., Hurowitz, J.A., Leshin, L.A., Lewis, K.W., McLennan, S.M., Miller, K.E., Moersch, J., Morris, R.V., Navarro-González, R., Pavlov, A.A., Perrett, G.M., Pradler, I., Squyres, S.W., Summons, R.E., Steele, A., Stolper, E.M., Sumner, D.Y., Szopa, C., Teinturier, S., Trainer, M.G., Treiman, A.H., Vaniman, D.T., Vasavada, A.R., Webster, C.R., Wray, J.J., Yingst, R.A., MSL Science Team, 2014. Volatile and Organic Compositions of Sedimentary Rocks in Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. *Science* 343, 1245267.
doi:10.1126/science.1245267
- Ming, D.W., Mittlefehldt, D.W., Morris, R.V., Golden, D.C., Gellert, R., Yen, A., Clark, B.C., Squyres, S.W., Farrand, W.H., Ruff, S.W., Arvidson, R.E., Klingelhöfer, G., McSween, H.Y., Rodionov, D.S., Schröder, C., de Souza, P.A., Wang, A., 2006. Geochemical and mineralogical indicators for aqueous processes in the Columbia Hills of Gusev crater, Mars. *J. Geophys. Res. Planets* 111, E02S12. doi:10.1029/2005JE002560
- Mitri, G., Meriggiola, R., Hayes, A., Lefevre, A., Tobie, G., Genova, A., Lunine, J.I., Zebker, H., 2014. Shape, topography, gravity anomalies and tidal deformation of Titan. *Icarus* 236, 169–177. doi:10.1016/j.icarus.2014.03.018
- Mittlefehldt, D.W., 1994. ALH84001, a cumulate orthopyroxenite member of the martian meteorite clan. *Meteoritics* 29, 214–221. doi:10.1111/j.1945-5100.1994.tb00673.x
- Mojzsis, S.J., Arrhenius, G., McKeegan, K.D., Harrison, T.M., Nutman, A.P., Friend, C.R.L., 1996. Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature* 384, 55–59.
doi:10.1038/384055a0
- Moldoveanu, S.C., David, V., 2002. *Sample Preparation in Chromatography*. Elsevier.
- Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H., 1958. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Anal. Chem.* 30, 1185–1190.
doi:10.1021/ac60139a005
- Moore, S., Stein, W.H., 1963. [117] Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods Enzymol.* 6, 819–831.
- Moore, W.B., Schubert, G., 2003. The tidal response of Ganymede and Callisto with and without liquid water oceans. *Icarus* 166, 223–226. doi:10.1016/j.icarus.2003.07.001
- Moritz, A., 2010. The Origin of Life [WWW Document]. Orig. Life. URL <http://www.talkorigins.org/faqs/abioprob/originoflife.html> (accessed 11.24.14).
- Morris, R.V., Ruff, S.W., Gellert, R., Ming, D.W., Arvidson, R.E., Clark, B.C., Golden, D.C., Siebach, K., Klingelhöfer, G., Schröder, C., Fleischer, I., Yen, A.S., Squyres, S.W., 2010. Identification of Carbonate-Rich Outcrops on Mars by the Spirit Rover. *Science* 329, 421–424. doi:10.1126/science.1189667
- Mumma, M.J., DiSanti, M.A., Dello Russo, N., Magee-Sauer, K., Gibb, E., Novak, R., 2003. Remote infrared observations of parent volatiles in comets: A window on the early solar system. *Adv. Space Res.* 31, 2563–2575. doi:10.1016/S0273-1177(03)00578-7
- Mumma, M.J., McLean, I.S., DiSanti, M.A., Larkin, J.E., Russo, N.D., Magee-Sauer, K., Becklin, E.E., Bida, T., Chaffee, F., Conrad, A.R., Figer, D.F., Gilbert, A.M., Graham, J.R., Levenson, N.A., Novak, R.E., Reuter, D.C., Teplitz, H.I., Wilcox, M.K., Xu, L.-H., 2001. A

- Survey of Organic Volatile Species in Comet C/1999 H1 (Lee) Using NIRSPEC at the Keck Observatory. *Astrophys. J.* 546, 1183. doi:10.1086/318314
- Mumma, M.J., Villanueva, G.L., Novak, R.E., Hewagama, T., Bonev, B.P., DiSanti, M.A., Mandell, A.M., Smith, M.D., 2009. Strong Release of Methane on Mars in Northern Summer 2003. *Science* 323, 1041–1045. doi:10.1126/science.1165243
- Munier, R., 1958. Analyse Quantitative Des Aminoacides Aromatiques (tyrosine Et Phenylalanine) Contenus Dans Lhydrolysate Dune Faible Quantite De Proteine Radioactive Par Chromatographie Sur Papier. *J. Chromatogr.* 1, 524–533. doi:10.1016/S0021-9673(00)93456-3
- Muñoz Caro, G.M., Meierhenrich, U.J., Schutte, W.A., Barbier, B., Arcones Segovia, A., Rosenbauer, H., Thiemann, W.H.-P., Brack, A., Greenberg, J.M., 2002. Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Nature* 416, 403–406. doi:10.1038/416403a
- Mustard, J.F., Poulet, F., Gendrin, A., Bibring, J.-P., Langevin, Y., Gondet, B., Mangold, N., Bellucci, G., Altieri, F., 2005. Olivine and Pyroxene Diversity in the Crust of Mars. *Science* 307, 1594–1597. doi:10.1126/science.1109098
- National Research Council, Committee on Innovative Remediation Technologies, Water Science and Technology Board, Board on Radioactive Waste Management, Commission on Geosciences, Environment and Resources, 1997. *Innovations in Ground Water and Soil Cleanup: From Concept to Commercialization*. National Academies Press.
- Navarro-González, R., Navarro, K.F., Rosa, J. de la, Iñiguez, E., Molina, P., Miranda, L.D., Morales, P., Cienfuegos, E., Coll, P., Raulin, F., Amils, R., McKay, C.P., 2006. The limitations on organic detection in Mars-like soils by thermal volatilization–gas chromatography–MS and their implications for the Viking results. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16089–16094. doi:10.1073/pnas.0604210103
- Navarro-González, R., Rainey, F.A., Molina, P., Bagaley, D.R., Hollen, B.J., Rosa, J. de la, Small, A.M., Quinn, R.C., Grunthaner, F.J., Cáceres, L., Gomez-Silva, B., McKay, C.P., 2003. Mars-Like Soils in the Atacama Desert, Chile, and the Dry Limit of Microbial Life. *Science* 302, 1018–1021. doi:10.1126/science.1089143
- Navarro-Gonzalez, R., Rainey, F., Friedmann, E., Molina, P., McKay, C., 2002. Mars' like Soils in the Atacama Desert, Chile, in: 34th COSPAR Scientific Assembly. Presented at the 34th COSPAR Scientific Assembly, p. 2653.
- Navarro-González, R., Vargas, E., de la Rosa, J., Raga, A.C., McKay, C.P., 2010. Reanalysis of the Viking results suggests perchlorate and organics at midlatitudes on Mars. *J. Geophys. Res. Planets* 115, E12010. doi:10.1029/2010JE003599
- Neukum, G., Jaumann, R., Hoffmann, H., Hauber, E., Head, J.W., Basilevsky, A.T., Ivanov, B.A., Werner, S.C., van Gasselt, S., Murray, J.B., McCord, T., Team, T.H.C.-I., 2004. Recent and episodic volcanic and glacial activity on Mars revealed by the High Resolution Stereo Camera. *Nature* 432, 971–979. doi:10.1038/nature03231
- Niemann, H., Atreya, S., Bauer, S.J., Biemann, K., Block, B., Carignan, G., Donahue, T., Frost, L., Gautier, D., Harpold, D., 1997. The gas chromatograph mass spectrometer aboard Huygens. *Eur. SPACE AGENCY-Publ.-ESA SP 1177*, 85–108.
- Nixon, C.A., Jennings, D.E., Bézard, B., Vinatier, S., Teanby, N.A., Sung, K., Ansty, T.M., Irwin, P.G.J., N. Gorius, Cottini, V., Coustenis, A., Flasar, F.M., 2013. Detection of Propene in Titan's Stratosphere. *Astrophys. J. Lett.* 776, L14. doi:10.1088/2041-8205/776/1/L14

- Nuevo, M., Auger, G., Blanot, D., d'Hendecourt, L., 2008. A detailed study of the amino acids produced from the vacuum UV irradiation of interstellar ice analogs. *Orig. Life Evol. Biospheres* 38, 37–56.
- Nuevo, M., Meierhenrich, U., d'Hendecourt, L., Muñoz Caro, G., Dartois, E., Deboffle, D., Thiemann, W.H.P., Bredehoft, J.H., Nahon, L., 2007. Enantiomeric separation of complex organic molecules produced from irradiation of interstellar/circumstellar ice analogs. *Adv. Space Res.* 39, 400–404.
- Öberg, K.I., Boogert, A.C.A., Pontoppidan, K.M., Broek, S. van den, Dishoeck, E.F. van, Bottinelli, S., Blake, G.A., Ii, N.J.E., 2011. The Spitzer Ice Legacy: Ice Evolution from Cores to Protostars. *Astrophys. J.* 740, 109. doi:10.1088/0004-637X/740/2/109
- Orgel, L.E., 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39, 99–123. doi:10.1080/10409230490460765
- Orzechowska, G.E., Kidd, R.D., Foing, B.H., Kanik, I., Stoker, C., Ehrenfreund, P., 2011. Analysis of Mars analogue soil samples using solid-phase microextraction, organic solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Int. J. Astrobiol.* 10, 209–219. doi:10.1017/S1473550410000443
- Osterloo, M.M., Hamilton, V.E., Bandfield, J.L., Glotch, T.D., Baldrige, A.M., Christensen, P.R., Tornabene, L.L., Anderson, F.S., 2008. Chloride-Bearing Materials in the Southern Highlands of Mars. *Science* 319, 1651–1654. doi:10.1126/science.1150690
- Owen, T., 1992. The composition and early history of the atmosphere of Mars, in: *Mars*. pp. 818–834.
- Oyama, V.I., Berdahl, B.J., 1979. A model of Martian surface chemistry. *J. Mol. Evol.* 14, 199–210. doi:10.1007/BF01732378
- Oyama, V.I., Berdahl, B.J., 1977. The Viking Gas Exchange Experiment results from Chryse and Utopia surface samples. *J. Geophys. Res.* 82, 4669–4676. doi:10.1029/JS082i028p04669
- Ozols, J., 1990. [44] Amino acid analysis, in: Murray P. Deutscher (Ed.), *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. Academic Press, pp. 587–601.
- Pappalardo, R., Senske, D., Prockter, L., Paczkowski, B., Vance, S., Goldstein, B., Magner, T., Cooke, B., 2015. Science and Reconnaissance from the Europa Clipper Mission Concept: Exploring Europa's Habitability. Presented at the EGU General Assembly 2015.
- Pappalardo, R.T., Belton, M.J.S., Breneman, H.H., Carr, M.H., Chapman, C.R., Collins, G.C., Denk, T., Fagents, S., Geissler, P.E., Giese, B., Greeley, R., Greenberg, R., Head, J.W., Helfenstein, P., Hoppa, G., Kadel, S.D., Klaasen, K.P., Klemaszewski, J.E., Magee, K., McEwen, A.S., Moore, J.M., Moore, W.B., Neukum, G., Phillips, C.B., Prockter, L.M., Schubert, G., Senske, D.A., Sullivan, R.J., Tufts, B.R., Turtle, E.P., Wagner, R., Williams, K.K., 1999. Does Europa have a subsurface ocean? Evaluation of the geological evidence. *J. Geophys. Res. Planets* 104, 24015–24055. doi:10.1029/1998JE000628
- Pendleton, Y.J., Allamandola, L.J., 2002. The Organic Refractory Material in the Diffuse Interstellar Medium: Mid-Infrared Spectroscopic Constraints. *Astrophys. J. Suppl. Ser.* 138, 75. doi:10.1086/322999
- Pilleri, P., Herberth, D., Giesen, T.F., Gerin, M., Joblin, C., Mulas, G., Mallocci, G., Grabow, J.-U., Brünken, S., Surin, L., Steinberg, B.D., Curtis, K.R., Scott, L.T., 2009. Search for corannulene (C₂₀H₁₀) in the Red Rectangle. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 397, 1053–1060. doi:10.1111/j.1365-2966.2009.15067.x

- Pizzarello, S., 2006. The Chemistry of Life's Origin: A Carbonaceous Meteorite Perspective. *Acc. Chem. Res.* 39, 231–237. doi:10.1021/ar050049f
- Pizzarello, S., Cooper, G.W., 2001. Molecular and chiral analyses of some protein amino acid derivatives in the Murchison and Murray meteorites. *Meteorit. Planet. Sci.* 36, 897–909.
- Pizzarello, S., Cronin, J., 2000. Non-racemic amino acids in the Murray and Murchison meteorites. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 329–338.
- Pizzarello, S., Cronin, J.R., 1998. Alanine enantiomers in the Murchison meteorite. *Nature* 394, 236–236. doi:10.1038/28306
- Pizzarello, S., Huang, Y., Fuller, M., 2004. The carbon isotopic distribution of Murchison amino acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 4963–4969.
- Poole, A.M., 2006. Getting from an RNA world to modern cells just got a little easier. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 28, 105–108. doi:10.1002/bies.20367
- Postberg, F., Kempf, S., Schmidt, J., Brilliantov, N., Beinsen, A., Abel, B., Buck, U., Srama, R., 2009. Sodium salts in E-ring ice grains from an ocean below the surface of Enceladus. *Nature* 459, 1098–1101. doi:10.1038/nature08046
- Poulet, F., Bibring, J.-P., Mustard, J.F., Gendrin, A., Mangold, N., Langevin, Y., Arvidson, R.E., Gondet, B., Gomez, C., Berthé, M., Erard, S., Forni, O., Manaud, N., Poulleau, G., Soufflot, A., Combes, M., Drossart, P., Encrenaz, T., Fouchet, T., Melchiorri, R., Bellucci, G., Altieri, F., Formisano, V., Fonti, S., Capaccioni, F., Cerroni, P., Coradini, A., Korablev, O., Kottsov, V., Ignatiev, N., Titov, D., Zasova, L., Pinet, P., Schmitt, B., Sotin, C., Hauber, E., Hoffmann, H., Jaumann, R., Keller, U., Arvidson, R., Mustard, J., Forget, F., 2005. Phyllosilicates on Mars and implications for early martian climate. *Nature* 438, 623–627. doi:10.1038/nature04274
- Quinn, R.C., Zent, A.P., Grunthaner, F.J., Ehrenfreund, P., Taylor, C.L., Garry, J.R.C., 2005. Detection and characterization of oxidizing acids in the Atacama Desert using the Mars Oxidation Instrument. *Planet. Space Sci.* 53, 1376–1388. doi:10.1016/j.pss.2005.07.004
- Rees, M., 1946. The estimation of threonine and serine in proteins. *Biochem. J.* 40, 632.
- Remusat, L., Derenne, S., Robert, F., Knicker, H., 2005. New pyrolytic and spectroscopic data on Orgueil and Murchison insoluble organic matter: A different origin than soluble? *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 3919–3932. doi:10.1016/j.gca.2005.02.032
- Risoul, V., Renaud, V., Trouvé, G., Gilot, P., 2002. A laboratory pilot study of thermal decontamination of soils polluted by PCBs. Comparison with thermogravimetric analysis. *Waste Manag.* 22, 61–72. doi:10.1016/S0956-053X(01)00051-4
- Rivkin, A.S., Howell, E.S., Vilas, F., Lebofsky, L.A., 2002. Hydrated minerals on asteroids: The astronomical record. *Asteroids III* 1, 235–253.
- Roach, D., Gehrke, C.W., 1970. The hydrolysis of proteins. *J. Chromatogr. A* 52, 393–404.
- Rosenbauer, H., Fuselier, S., Ghielmetti, A., Greenberg, J., Goesmann, F., Ulamec, S., Israel, G., Livi, S., MacDermott, J., Matsuo, T., Pillinger, C., Raulin, F., Roll, R., Thiemann, W., 1999. The COSAC experiment on the Lander of the ROSETTA mission. *Adv. Space Res.* 23, 333–340. doi:10.1016/S0273-1177(99)00054-X
- Roth, L., Saur, J., Retherford, K.D., Strobel, D.F., Feldman, P.D., McGrath, M.A., Nimmo, F., 2014. Transient Water Vapor at Europa's South Pole. *Science* 343, 171–174. doi:10.1126/science.1247051
- Saint-Hilaire, J.B., 1883. *Histoire des animaux d'Aristote*. Hachette et cie.

- Sandford, S.A., Aléon, J., Alexander, C.M.O., Araki, T., Bajt, S., Baratta, G.A., Borg, J., Bradley, J.P., Brownlee, D.E., Brucato, J.R., Burchell, M.J., Busemann, H., Butterworth, A., Clemett, S.J., Cody, G., Colangeli, L., Cooper, G., D'Hendecourt, L., Djouadi, Z., Dworkin, J.P., Ferrini, G., Fleckenstein, H., Flynn, G.J., Franchi, I.A., Fries, M., Gilles, M.K., Glavin, D.P., Gounelle, M., Grossemy, F., Jacobsen, C., Keller, L.P., Kilcoyne, A.L.D., Leitner, J., Matrajt, G., Meibom, A., Mennella, V., Mostefaoui, S., Nittler, L.R., Palumbo, M.E., Papanastassiou, D.A., Robert, F., Rotundi, A., Snead, C.J., Spencer, M.K., Stadermann, F.J., Steele, A., Stephan, T., Tsou, P., Tyliczszak, T., Westphal, A.J., Wirick, S., Wopenka, B., Yabuta, H., Zare, R.N., Zolensky, M.E., 2006. Organics Captured from Comet 81P/Wild 2 by the Stardust Spacecraft. *Science* 314, 1720–1724. doi:10.1126/science.1135841
- Schaefer, L., Fegley Jr., B., 2007. Outgassing of ordinary chondritic material and some of its implications for the chemistry of asteroids, planets, and satellites. *Icarus* 186, 462–483. doi:10.1016/j.icarus.2006.09.002
- Schopf, J.W., Kudryavtsev, A.B., Agresti, D.G., Wdowiak, T.J., Czaja, A.D., 2002. Laser–Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* 416, 73–76. doi:10.1038/416073a
- Schopf, J.W., Kudryavtsev, A.B., Czaja, A.D., Tripathi, A.B., 2007. Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils. *Precambrian Res.* 158, 141–155. doi:10.1016/j.precamres.2007.04.009
- Schuerger, A.C., Fajardo-Cavazos, P., Clausen, C.A., Moores, J.E., Smith, P.H., Nicholson, W.L., 2008. Slow degradation of ATP in simulated martian environments suggests long residence times for the biosignature molecule on spacecraft surfaces on Mars. *Icarus* 194, 86–100. doi:10.1016/j.icarus.2007.10.010
- Sephton, M.A., 2002. Organic compounds in carbonaceous meteorites. *Nat. Prod. Rep.* 19, 292–311. doi:10.1039/B103775G
- Sephton, M.A., Botta, O., 2005. Recognizing life in the Solar System: guidance from meteoritic organic matter. *Int. J. Astrobiol.* 4, 269–276. doi:10.1017/S1473550405002806
- Sephton, M.A., Love, G.D., Meredith, W., Snape, C.E., Sun, C.-G., Watson, J.S., 2005. Hydropyrolysis: A new technique for the analysis of macromolecular material in meteorites. *Planet. Space Sci.* 53, 1280–1286. doi:10.1016/j.pss.2005.06.008
- Sephton, M.A., Love, G.D., Watson, J.S., Verchovsky, A.B., Wright, I.P., Snape, C.E., Gilmour, I., 2004. Hydropyrolysis of insoluble carbonaceous matter in the Murchison meteorite: new insights into its macromolecular structure. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 1385–1393. doi:10.1016/j.gca.2003.08.019
- Sephton, M.A., Pillinger, C.T., Gilmour, I., 2001. Supercritical fluid extraction of the non-polar organic compounds in meteorites. *Planet. Space Sci.* 49, 101–106. doi:10.1016/S0032-0633(00)00122-7
- Sephton, M.A., Pillinger, C.T., Gilmour, I., 1998. $\delta^{13}\text{C}$ of free and macromolecular aromatic structures in the murchison meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 1821–1828. doi:10.1016/S0016-7037(98)00108-2
- Shirey, T.B., Olson, J.B., 2012. Microbial Life in the Atacama Desert: Using a Multidisciplinary Approach to Examine the Habitability Potential and Microbial Diversity in a Mars Analog Environment. Presented at the Life Detection in Extraterrestrial Samples, Lunar and Planetary Institute.

- Shock, E.L., Schulte, M.D., 1990. Summary and implications of reported amino acid concentrations in the Murchison meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54, 3159–3173.
- Simoneit, B.R.T., 2002. Molecular indicators (biomarkers) of past life. *Anat. Rec.* 268, 186–195. doi:10.1002/ar.10153
- Smith, P.H., Tamppari, L.K., Arvidson, R.E., Bass, D., Blaney, D., Boynton, W.V., Carswell, A., Catling, D.C., Clark, B.C., Duck, T., DeJong, E., Fisher, D., Goetz, W., Gunnlaugsson, H.P., Hecht, M.H., Hipkin, V., Hoffman, J., Hviid, S.F., Keller, H.U., Kounaves, S.P., Lange, C.F., Lemmon, M.T., Madsen, M.B., Markiewicz, W.J., Marshall, J., McKay, C.P., Mellon, M.T., Ming, D.W., Morris, R.V., Pike, W.T., Renno, N., Staufer, U., Stoker, C., Taylor, P., Whiteway, J.A., Zent, A.P., 2009. H₂O at the Phoenix Landing Site. *Science* 325, 58–61. doi:10.1126/science.1172339
- Snyder, L.E., Lovas, F.J., Hollis, J.M., Friedel, D.N., Jewell, P.R., Remijan, A., Ilyushin, V.V., Alekseev, E.A., Dyubko, S.F., 2005. A Rigorous Attempt to Verify Interstellar Glycine. *Astrophys. J.* 619, 914. doi:10.1086/426677
- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.* 30, 1190–1206. doi:10.1021/ac60139a006
- Squyres, S.W., Grotzinger, J.P., Arvidson, R.E., Bell, J.F., Calvin, W., Christensen, P.R., Clark, B.C., Crisp, J.A., Farrand, W.H., Herkenhoff, K.E., Johnson, J.R., Klingelhöfer, G., Knoll, A.H., McLennan, S.M., McSween, H.Y., Morris, R.V., Rice, J.W., Rieder, R., Soderblom, L.A., 2004. In Situ Evidence for an Ancient Aqueous Environment at Meridiani Planum, Mars. *Science* 306, 1709–1714. doi:10.1126/science.1104559
- Stalport, F., Glavin, D.P., Eigenbrode, J.L., Bish, D., Blake, D., Coll, P., Szopa, C., Buch, A., McAdam, A., Dworkin, J.P., Mahaffy, P.R., 2012. The influence of mineralogy on recovering organic acids from Mars analogue materials using the “one-pot” derivatization experiment on the Sample Analysis at Mars (SAM) instrument suite. *Planet. Space Sci.* 67, 1–13. doi:10.1016/j.pss.2012.02.010
- Stanjek, H., 2003. Hydroxides and oxyhydroxide minerals, in: *Sedimentology, Encyclopedia of Earth Science*. Springer Netherlands, pp. 592–595.
- Steele, A., Beaty, D.W., Amend, J., Anderson, R., Beegle, L., Benning, L., Bhattacharya, J., Blake, D., Brinckerhoff, W., Biddle, J., 2006. The Astrobiology Field Laboratory: Final report of the MEPAG Astrobiology Field Laboratory Science Steering Group (AFL-SSG). *Jet Propuls. Lab. Doc. Ref CL 06–3307*.
- Stenerson, K.K., 2007. The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GC-MS. *Supelco Report. Newsl. Arch.* 2005-2010 25.3, 17–18.
- Sternberg, R., Szopa, C., Coscia, D., Zubrzycki, S., Raulin, F., Vidal-Madjar, C., Niemann, H., Israel, G., 1999. Gas chromatography in space exploration: Capillary and micropacked columns for in situ analysis of Titan’s atmosphere. *J. Chromatogr. A* 846, 307–315. doi:10.1016/S0021-9673(99)00254-X
- Stevenson, D., 2000. Europa’s Ocean--the Case Strengthens. *Science* 289, 1305–1307. doi:10.1126/science.289.5483.1305
- Stockton, A.M., Chiesl, T.N., Lowenstein, T.K., Amashukeli, X., Grunthaner, F., Mathies, R.A., 2009. Capillary electrophoresis analysis of organic amines and amino acids in saline and acidic samples using the Mars organic analyzer. *Astrobiology* 9, 823–831. doi:10.1089/ast.2009.0357

- Stofan, E.R., Elachi, C., Lunine, J.I., Lorenz, R.D., Stiles, B., Mitchell, K.L., Ostro, S., Soderblom, L., Wood, C., Zebker, H., Wall, S., Janssen, M., Kirk, R., Lopes, R., Paganelli, F., Radebaugh, J., Wye, L., Anderson, Y., Allison, M., Boehmer, R., Callahan, P., Encrenaz, P., Flamini, E., Francescetti, G., Gim, Y., Hamilton, G., Hensley, S., Johnson, W.T.K., Kelleher, K., Muhleman, D., Paillou, P., Picardi, G., Posa, F., Roth, L., Seu, R., Shaffer, S., Vetrella, S., West, R., 2007. The lakes of Titan. *Nature* 445, 61–64. doi:10.1038/nature05438
- Stoks, P.G., Schwartz, A.W., 1981. Nitrogen-heterocyclic compounds in meteorites: significance and mechanisms of formation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 563–569. doi:10.1016/0016-7037(81)90189-7
- Stoks, P.G., Schwartz, A.W., 1979. Uracil in carbonaceous meteorites. *Nature* 282, 709–710. doi:10.1038/282709a0
- Stribling, R., Miller, S.L., 1987. Energy yields for hydrogen cyanide and formaldehyde syntheses: The hcn and amino acid concentrations in the primitive ocean. *Orig. Life Evol. Biosph.* 17, 261–273. doi:10.1007/BF02386466
- Summers, M.E., Lieb, B.J., Chapman, E., Yung, Y.L., 2002. Atmospheric biomarkers of subsurface life on Mars. *Geophys. Res. Lett.* 29, 24–1–24–4. doi:10.1029/2002GL015377
- Summons, R.E., Amend, J.P., Bish, D., Buick, R., Cody, G.D., Des Marais, D.J., Dromart, G., Eigenbrode, J.L., Knoll, A.H., Sumner, D.Y., 2011. Preservation of Martian Organic and Environmental Records: Final Report of the Mars Biosignature Working Group. *Astrobiology* 11, 157–181. doi:10.1089/ast.2010.0506
- Sutter, B., Heil, E., Archer, P.D., Ming, D.W., Eignebrode, J.L., Franz, H.B., Glavin, D.P., McAdam, A.C., Mahaffy, P.R., Niles, P.B., Stern, J.C., Navarro-Gonzalez, R., McKay, C.P., MSL Science Team, 2014. The Investigation of Magnesium Perchlorate/Iron Phase-Mineral Mixtures as a Possible Source of Oxygen and Chlorine Detected by the Sample Analysis at Mars (SAM) Instrument in Gale Crater. Presented at the Eighth International Conference on Mars, p. 1140.
- Szopa, C., Sternberg, R., Coscia, D., Raulin, F., Vidal-Madjar, C., Rosenbauer, H., 2002. Gas chromatography for in situ analysis of a cometary nucleus: III. Multi-capillary column system for the cometary sampling and composition experiment of the Rosetta lander probe. *J. Chromatogr. A* 953, 165–173. doi:10.1016/S0021-9673(02)00104-8
- Szopa, C., Sternberg, R., Rodier, C., Coscia, D., Raulin, F., 2001. Development and analytical aspects of gas chromatography for space exploration. *LC GC Eur.* 14, 114–121.
- Szwast, M.A., Richardson, M.I., Vasavada, A.R., 2006. Surface dust redistribution on Mars as observed by the Mars Global Surveyor and Viking orbiters. *J. Geophys. Res. Planets* 111, E11008. doi:10.1029/2005JE002485
- Tian, F., Toon, O.B., Pavlov, A.A., Sterck, H.D., 2005. A Hydrogen-Rich Early Earth Atmosphere. *Science* 308, 1014–1017. doi:10.1126/science.1106983
- Treiman, A.H., Gleason, J.D., Bogard, D.D., 2000. The SNC meteorites are from Mars. *Planet. Space Sci., Mars Exploration Program* 48, 1213–1230. doi:10.1016/S0032-0633(00)00105-7
- Tsugita, A., Uchida, T., Mewes, H., Ataka, T., 1987. A Rapid Vapor-Phase Acid (hydrochloric-Acid and Trifluoroacetic-Acid) Hydrolysis of Peptide and Protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 102, 1593–1597.
- Vaniman, D.T., Bish, D.L., Ming, D.W., Bristow, T.F., Morris, R.V., Blake, D.F., Chipera, S.J., Morrison, S.M., Treiman, A.H., Rampe, E.B., Rice, M., Achilles, C.N., Grotzinger, J.P.,

- McLennan, S.M., Williams, J., Bell III, J.F., Newsom, H.E., Downs, R.T., Maurice, S., Sarrazin, P., Yen, A.S., Morookian, J.M., Farmer, J.D., Stack, K., Milliken, R.E., Ehlmann, B.L., Sumner, D.Y., Berger, G., Crisp, J.A., Hurowitz, J.A., Anderson, R., Des Marais, D.J., Stolper, E.M., Edgett, K.S., Gupta, S., Spanovich, N., MSL Science Team, 2014. Mineralogy of a Mudstone at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. *Science* 343, 1243480. doi:10.1126/science.1243480
- van Zuilen, M.A., Lepland, A., Arrhenius, G., 2002. Reassessing the evidence for the earliest traces of life. *Nature* 418, 627–630. doi:10.1038/nature00934
- Villanueva, G.L., Mumma, M.J., Novak, R.E., Radeva, Y.L., Käufel, H.U., Smette, A., Tokunaga, A., Khayat, A., Encrenaz, T., Hartogh, P., 2013. A sensitive search for organics (CH₄, CH₃OH, H₂CO, C₂H₆, C₂H₂, C₂H₄), hydroperoxyl (HO₂), nitrogen compounds (N₂O, NH₃, HCN) and chlorine species (HCl, CH₃Cl) on Mars using ground-based high-resolution infrared spectroscopy. *Icarus* 223, 11–27. doi:10.1016/j.icarus.2012.11.013
- Wacey, D., Kilburn, M.R., Saunders, M., Cliff, J., Brasier, M.D., 2011. Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia. *Nat. Geosci.* 4, 698–702. doi:10.1038/ngeo1238
- Waite, J.H., Combi, M.R., Ip, W.-H., Cravens, T.E., McNutt, R.L., Kasprzak, W., Yelle, R., Luhmann, J., Niemann, H., Gell, D., Magee, B., Fletcher, G., Lunine, J., Tseng, W.-L., 2006. Cassini Ion and Neutral Mass Spectrometer: Enceladus Plume Composition and Structure. *Science* 311, 1419–1422. doi:10.1126/science.1121290
- Waite, J.H., Young, D.T., Cravens, T.E., Coates, A.J., Crary, F.J., Magee, B., Westlake, J., 2007. The Process of Tholin Formation in Titan's Upper Atmosphere. *Science* 316, 870–875. doi:10.1126/science.1139727
- Walker, J.C., 1977. *Evolution of the Atmosphere*. N. Y. Macmillan Lond. Collier Macmillan 1977 1.
- Wang, A., Haskin, L.A., Squyres, S.W., Jolliff, B.L., Crumpler, L., Gellert, R., Schröder, C., Herkenhoff, K., Hurowitz, J., Tosca, N.J., Farrand, W.H., Anderson, R., Knudson, A.T., 2006. Sulfate deposition in subsurface regolith in Gusev crater, Mars. *J. Geophys. Res. Planets* 111, E02S17. doi:10.1029/2005JE002513
- Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738. doi:10.1038/171737a0
- Wayne, R.K., Leonard, J.A., Cooper, A., 1999. Full of Sound and Fury: The Recent History of Ancient DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30, 457–477.
- Webster, C.R., Mahaffy, P.R., Atreya, S.K., Flesch, G.J., Farley, K.A., MSL Science Team, 2013. Low Upper Limit to Methane Abundance on Mars. *Science* 342, 355–357. doi:10.1126/science.1242902
- Webster, C.R., Mahaffy, P.R., Atreya, S.K., Flesch, G.J., Mischna, M.A., Meslin, P.-Y., Farley, K.A., Conrad, P.G., Christensen, L.E., Pavlov, A.A., Martín-Torres, J., Zorzano, M.-P., McConnochie, T.H., Owen, T., Eigenbrode, J.L., Glavin, D.P., Steele, A., Malespin, C.A., Archer, P.D., Sutter, B., Coll, P., Freissinet, C., McKay, C.P., Moores, J.E., Schwenzer, S.P., Bridges, J.C., Navarro-Gonzalez, R., Gellert, R., Lemmon, M.T., Team, the M.S., 2015. Mars methane detection and variability at Gale crater. *Science* 347, 415–417. doi:10.1126/science.1261713
- Weisberg, M.K., McCoy, T.J., Krot, A.N., 2006. Systematics and evaluation of meteorite classification. *Meteor. Early Sol. Syst. II* 1, 19–52.
- Whipple, F.L., 1950. A comet model. I. The acceleration of Comet Encke. *Astrophys. J.* 111, 375–394.

- Yen, A.S., 2000. Evidence That the Reactivity of the Martian Soil Is Due to Superoxide Ions. *Science* 289, 1909–1912. doi:10.1126/science.289.5486.1909
- Zent, A.P., McKay, C.P., 1994. The Chemical Reactivity of the Martian Soil and Implications for Future Missions. *Icarus* 108, 146–157. doi:10.1006/icar.1994.1047
- Zhao, M., Bada, J.L., 1989. Extraterrestrial amino acids in Cretaceous/Tertiary boundary sediments at Stevns Klint, Denmark. *Nature* 339, 463–465. doi:10.1038/339463a0
- Zhong, F., 2014. Mars In-Situ Organic Detection Instrument Using Supercritical CO₂ Extraction [WWW Document]. URL <http://astrobiology.nasa.gov/astep/projects/nra/nnh11zda001n-astid/mars-in-situ-organic-detection-instrument-using-su/> (accessed 11.26.14).
- Zhu, T.F., Szostak, J.W., 2009. Coupled growth and division of model protocell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 5705–5713. doi:10.1021/ja900919c

Chapitre II : Impact de l'hydrolyse acide sur le recouvrement des acides aminés. Application à l'extraction des acides aminés issus de météorites / sols analogues martiens

2.1) Introduction

Comme expliqué précédemment, l'hydrolyse à l'acide chlorhydrique (HCl) liquide a déjà été utilisée pour extraire des acides aminés à partir de matrices minérales, mais à notre connaissance, aucune étude d'une possible perte quantitative portant sur un nombre aussi important d'acides aminés n'a été publiée à ce jour. L'hydrolyse au HCl à 6 mol.L⁻¹ (nous utiliserons par la suite la dénomination « HCl 6M ») en phase liquide a été utilisée depuis au moins 1970 et a été pendant longtemps la procédure de référence pour extraire les acides aminés des météorites ou des analogues de sols extraterrestres. Le but proposé de cette étude est de déterminer s'il y a une perte d'acides aminés causée par l'hydrolyse au HCl en phase liquide. L'effet d'un contact rapide avec du HCl à 6M non chauffé a également été testé. Toutes nos expériences ont été réalisées avec une solution standard d'acides aminés contenant 17 des 20 acides aminés protéinogéniques, molécules d'intérêt exobiologique. De plus, la fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA (*N*-méthyl-*N*-*tert*-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide), étape précédant leur séparation et détection par CPG-SM, est d'importance dans le cadre des applications spatiales. En effet, cette technique a déjà été utilisée et le sera à nouveau dans des environnements extraterrestres (par exemple, Sample Analysis at Mars, ou encore Mars Organic Molecule Analyzer).

2.2) Produits, matériels et méthodes

2.2.1) Produits

La solution standard d'acides aminés utilisée pour l'ensemble des expériences de cette thèse provient de chez Fluka (France). Il s'agit d'une solution de HCl 0,1M contenant les 17

acides aminés suivants : L-alanine, glycine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-proline, L-méthionine, L-serine, L-threonine, L-phenylalanine, acide L-aspartique, acide L-glutamique, L-lysine, L-arginine, L-histidine, L-tyrosine et L-cystine. Par la suite, il est possible qu'ils soient cités en omettant le préfix « L- », ou bien en utilisant leurs acronymes, respectivement : Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Ser, Thr, Phe, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Tyr et Cys. Les concentrations sont de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ pour tous les acides aminés, excepté la cystine qui se trouve à la concentration de $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

L'eau utilisée pour toutes les expériences est obtenue à partir d'un purificateur d'eau Milli-Q de la marque Millipore, fournissant une eau ultrapure à 14.7 MΩ, exempte de tout contaminant minéral ou organique.

Pour l'ensemble de nos expériences, afin d'éviter les contaminations, la verrerie est rincée à l'eau ultrapure, enroulée dans du papier aluminium, et chauffée au four à 500°C pendant 3 heures.

Le MTBSTFA (pureté $\geq 97,0\%$) provient de chez Fluka et le DMF (pureté 99,8%) de chez Alfa Aesar. Les réactions de fonctionnalisation ont été réalisées pendant 15 minutes à 75°C après mélange de la solution grâce à un vortex.

Pour toutes les expériences, une solution de laurate de méthyle (dodécanoate de méthyle) (provenance Fluka, pureté 97%) a été utilisée comme étalon interne. L'ajout d'un étalon interne en quantité connue est une technique qui permet de s'affranchir de certains biais, comme par exemple celui lié à la réponse du spectromètre de masse (qui n'est pas parfaitement proportionnelle à la quantité du soluté étudié) ; ou encore de faire fi de la variabilité des résultats, causée par la préparation de l'échantillon, l'injection manuelle, ou l'appareillage. Un étalon interne doit remplir certains critères : ne pas être contenu dans le mélange à étudier ; pouvoir être séparé des autres constituants du mélange ; avoir des propriétés physico-chimiques proches des molécules à étudier ; et ne pas réagir avec d'autres espèces en présence (comme le solvant et les réactifs de fonctionnalisation). Le laurate de méthyle remplit ces critères : dans les conditions utilisées, il ne co-élue avec aucun des composés analysés ; il possède un spectre de masse typique qui rend son identification aisée ; il ne réagit pas avec le DMF ni avec le MTBSTFA ; et sa volatilité est suffisamment faible pour être utilisé avec des acides aminés. Le laurate de méthyle possède une masse molaire de $214,35 \text{ g.mol}^{-1}$ et une température d'ébullition de 262°C (figure II-1).

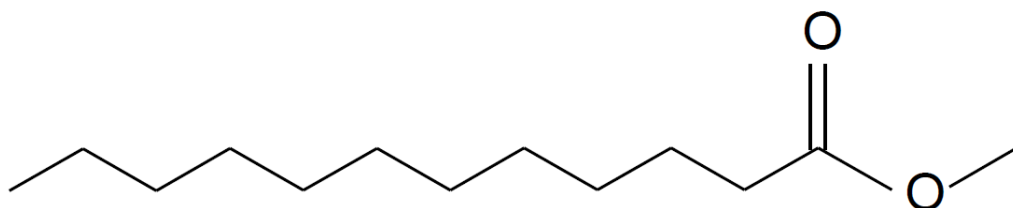


Figure II-1: formule du laurate de méthyle ou dodécanoate de méthyle

Lorsque qu'une évaporation est mentionnée, elle implique obligatoirement une évaporation à 40°C, sous flux constant d'argon, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

2.2.2) Fonctionnalisation au MTBSTFA dans du DMF

Au cours de cette thèse, la fonctionnalisation chimique des acides aminés est réalisée par silylation au MTBSTFA (figure II-2), avec pour solvant le DMF.

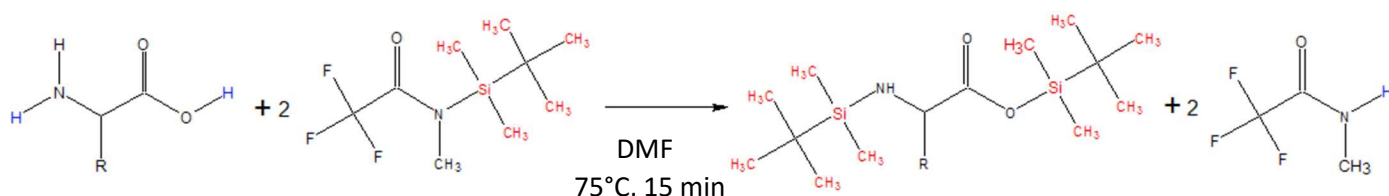


Figure II-2. Schéma de la réaction de fonctionnalisation entre un acide aminé et le MTBSTFA

Dans le domaine de la chimie analytique, la fonctionnalisation est généralement utilisée pour deux raisons : (1) afin de permettre l'analyse de composés non analysables pour cause, par exemple, de volatilité ou stabilité inadéquate, et (2) afin d'améliorer l'analyse, par exemple en améliorant le comportement chromatographique ou la détectabilité. Dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse, la raison principale de la fonctionnalisation (par alkylation, acylation, ou silylation) est d'augmenter la volatilité de composés non volatils (Knapp, 1979). Elle permet de modifier les propriétés physico-chimiques des composés cibles afin de les rendre suffisamment volatils pour qu'ils puissent être séparés sur une colonne chromatographique en phase gazeuse (Botta and Bada, 2002).

En effet, certains composés organiques polaires qui contiennent des atomes d'hydrogène labiles (par exemple au sein de groupes hydroxyle, amino et thiol), possèdent typiquement une faible volatilité due à leur tendance à s'associer entre eux ou à s'associer avec des liquides polaires ou des matrices solides, à travers la formation de liaisons hydrogènes (Knapp, 1979, dans Rodier *et al.*, 2001). C'est le cas des acides aminés.

Dans le cas de la silylation, le remplacement d'un hydrogène labile par un groupement silyle diminue la polarité du composé et donc limite la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires. Le dérivatif silylé est donc plus volatil. Il est également plus stable. Son comportement en CPG est amélioré (Moldoveanu and David, 2002). En général, l'avantage des réactions de silylation par rapport à d'autres méthodes de fonctionnalisation est qu'elles représentent une procédure en une seule étape qui ne requiert aucune séparation des dérivatifs avant l'analyse par CPG (Knapp, 1979, dans Rodier *et al.*, 2001).

Il est intéressant de noter que dans la littérature, pour qualifier les hydrogènes remplacés lors de la réaction de fonctionnalisation, il n'existe pas de consensus. Il est généralement fait mention d'hydrogènes actifs (ou encore protons actifs, ou sites protiques actifs, ou fonctions protique actives) (voir par exemple Knapp, 1979; Mawhinney *et al.*, 1986; Moldoveanu and David, 2002; Rodier *et al.*, 2001; Stenerson, 2007), plus rarement d'hydrogènes labiles (voir par exemple Freissinet *et al.*, 2010; Rodier *et al.*, 2001), voir même d'hydrogène réactif (Moldoveanu and David, 2002) ou d'hydrogène acide (Buch *et al.*, 2006). Dans ce cadre, ces termes sont utilisés comme synonymes. Nous avons choisi le terme d'utiliser le terme « hydrogène labile » (c'est-à-dire facilement détachable) car c'est le plus « parlant ».

Le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle procuré par le MTBSTFA présente l'avantage d'être considérablement plus stable que le groupement triméthylsilyle (abrégé par TMS ; procuré par exemple par le N-triméthylsilylimidazole, ou TMSI ; *cf.* Moldoveanu et David, 2002). De plus, le MTBSTFA est un donneur de groupement silyle très efficace, capable de « *tert*-butyldiméthylsilyler » des fonctions protiques actives (c'est-à-dire contenant des hydrogènes labiles) (telles que des groupements hydroxyle, amine, carboxyle et thiol) (Mawhinney *et al.*, 1986). Il a également été sélectionné car il est moins sensible à l'hydrolyse que d'autres réactifs utilisés pour la silylation. Les rendements typiques obtenus avec ce réactif sont supérieurs à 96% (Mawhinney *et al.*, 1982, dans Rodier *et al.*, 2001). Les dérivatifs

tBDMS sont plus thermiquement stables et moins sensibles à l'hydrolyse que les dérivatifs TMS (Moldoveanu and David, 2002).

Le DMF, quant à lui, est utilisé comme solvant polaire aprotique (aprotique étant synonyme de protophile, c'est-à-dire accepteur de protons, donc une base de Brønsted-Lowry), qui ne réagit pas avec le MTBSTFA. La silylation est communément réalisée dans un solvant ne possédant pas d'hydrogène labile (Moldoveanu and David, 2002). De plus, le but principal du solvant est de dissoudre l'analyte et le réactif de fonctionnalisation (Moldoveanu and David, 2002). Or, le DMF est également un accepteur – sans être donneur – de liaisons hydrogènes. Les solutés forment donc moins de liaisons hydrogène avec le solvant que dans le cas d'un solvant polaire protique (tel que l'eau). Il favorise la réaction de fonctionnalisation en favorisant la solubilisation des composés cibles. La différence entre les taux de fonctionnalisation avec et sans ajout de DMF est en effet conséquente (*e.g.*, Buch *et al.*, 2006). Mawhinney *et al.* (1986) ont montré que de très faibles résultats étaient obtenus lorsque les acides aminés étaient *tert*-butyldiméthylsilylés directement par le MTBSTFA en l'absence de solvant organique, ceci étant apparemment étroitement lié à l'observation que les acides aminés sont très peu solubles dans le MTBSTFA (Mawhinney *et al.*, 1986). La substitution du DMF par l'acétonitrile ou le DMSO (diméthyl sulfoxyde) a également entraîné une fonctionnalisation incomplète pour la plupart des acides aminés (Mawhinney *et al.*, 1986).

Les agents de silylation sont généralement sensibles à l'hydrolyse et doivent être protégés de l'humidité. L'eau présente dans le mélange des réactifs peut souvent gêner la réaction (en réagissant avec le réactif de silylation) et/ou hydrolyser le dérivatif (Moldoveanu and David, 2002), réduisant le rendement du dérivatif pour analyse (sauf si le MTBSTFA est en excès suffisant), ce qui dans notre cas pourrait être interprété à tort comme une dégradation des acides aminés pendant l'hydrolyse au HCl. Afin d'éviter cela, avant l'addition des réactifs de fonctionnalisation, les solutions d'acides aminés ont été complètement évaporées sous un flux constant d'argon. Le fait de placer les vials sous le flux d'argon vise à accroître la vitesse du processus d'évaporation. La température du processus d'évaporation est gardée suffisamment basse (40°C) afin d'éviter toute dégradation ou vaporisation des acides aminés.

Après addition simultanée du réactif de fonctionnalisation (MTBSTFA) et du solvant (DMF) au résidu sec de la solution d'acides aminés, les vials sont chauffés à 75°C pendant 15 minutes. Les dérivatifs volatils *tert*-butyldiméthylsilyls (tBDMS) résultants sont analysés par

CPG-SM. Une solution de laurate de méthyle est systématiquement ajoutée à chaque échantillon, après fonctionnalisation, en tant qu'étalon interne.

Les échantillons sont injectés immédiatement après fonctionnalisation. Les échantillons sont ensuite conservés au réfrigérateur, et si une ré-injection est nécessaire, elle est réalisée au maximum 6h après la fonctionnalisation. Mawhinney *et al.* (1986) ont montré que les acides aminés subissent une très faible dégradation au cours des 6h suivant la fonctionnalisation. Ceci est également vérifié pour tous les acides aminés neutres, acides, aromatiques et porteurs de groupements thiol, au cours des 24h suivant la fonctionnalisation. Cependant, les acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine) montrent une diminution constante de leur concentration à partir des 6h suivant la fonctionnalisation, indiquant une perte des dérivatifs. Dans leur étude, cette dégradation était particulièrement importante pour l'histidine et l'arginine, avec des pertes plus importantes dans le cas où le DMF n'était pas pur et déshydraté de toute humidité.

2.2.3) La séparation par chromatographie en phase gazeuse : optimisation

Au cours de cette thèse, toutes les analyses ont été réalisées avec un CPG-SM de la marque Thermo Scientific. Le chromatographe en phase gazeuse (Trace GC) est couplé à un spectromètre de masse de type quadripolaire (DSQ II).

Afin de s'assurer que toutes les expériences étaient réalisées en un laps de temps le plus court possible sans compromettre la résolution chromatographique, la sensibilité de la détection du spectromètre de masse, ou la gamme de détection du spectromètre de masse, les paramètres de température d'opération et les paramètres de l'instrument ont été déterminés avant la collecte des données expérimentales. Les principaux paramètres expérimentaux optimisés ont été ceux qui sont les plus importants pour la séparation des analytes : le split ratio, la programmation en température de la colonne chromatographique, et la vitesse du gaz vecteur (hélium).

La température de l'injecteur split/splitless, utilisé avec une valeur de split égale à 20, est de 250°C. Une colonne chromatographique capillaire ZB-5MSi (95% diméthylpolysiloxane, 5% phenyl; L=30m x I.D.=0.25mm x df=0.25µm) de la marque Zebron (France) a été utilisée,

avec une colonne de garde en silice désactivée (5 m x 0.25 mm). Sa température maximale de fonctionnement est de 360 à 370°C (isotherme/programme). Les conditions d'opération sont les suivantes : isotherme de 10 min à 120°C, suivi d'une première rampe à un taux de 3°C.min⁻¹ jusqu' à la température de 250°C. Une fois atteinte, cette température de 250°C est maintenue pendant une minute. Puis une deuxième rampe intervient à un taux de 10°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température finale de 300°C. Cette température est maintenue à 300°C durant 5 min afin d'éluer les composés les plus lourds.

La vitesse du gaz vecteur a été choisie dans l'optique de minimiser le temps d'analyse tout en maximisant l'efficacité de la colonne. Pour ce faire nous avons tracé une courbe dite de Van Deemter - Golay permettant de représenter la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) en fonction de la vitesse linéaire du gaz vecteur.

2.2.3.1) Théorie des plateaux, efficacité d'une colonne chromatographique et grandeurs de rétention

En 1941, Martin et Synge (Martin and Synge, 1941) ont proposé de comparer la colonne chromatographique à une colonne de distillation, considérant la colonne comme étant divisée en N disques cylindriques successifs fictifs, appelés plateaux théoriques. N est donc le nombre de plateaux théoriques. On considère alors que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Au niveau de chaque plateau, il y a un équilibre de répartition du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire (Figure II-3).

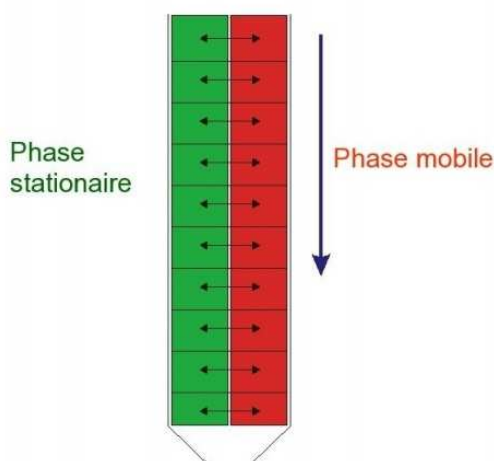


Figure II-3 : Illustration de la théorie des plateaux. Chaque étage représente un plateau théorique, dans lesquels le soluté est à l'équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile

Selon cette théorie, plus N est élevé, plus la colonne est efficace. N peut être déterminé selon l'équation :

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 \quad (\text{équation II-1})$$

Avec t_R le temps de rétention du soluté, c'est à dire le temps entre l'injection et la détection du soluté, et δ la largeur à mi-hauteur du pic chromatographique.

Il est également possible de calculer le nombre de plateaux effectif, appelé N' :

$$N' = 5,54 \left(\frac{t_R - t_M}{\delta} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R'}{\delta} \right)^2 \quad (\text{équation II-2})$$

Avec t_M le temps mort, temps pris par la phase mobile pour passer dans la colonne (équivalent au temps de rétention d'un composé non retenu, dans notre cas, le méthane), et t_R' le temps réduit, selon l'équation :

$$t_R' = t_R - t_M \quad (\text{équation II-3}) \quad (\text{figure II-4})$$

Ce calcul de N' , par l'emploi du temps réduit, permet, pour un même composé, d'établir des comparaisons entre différentes colonnes de caractéristiques différentes.

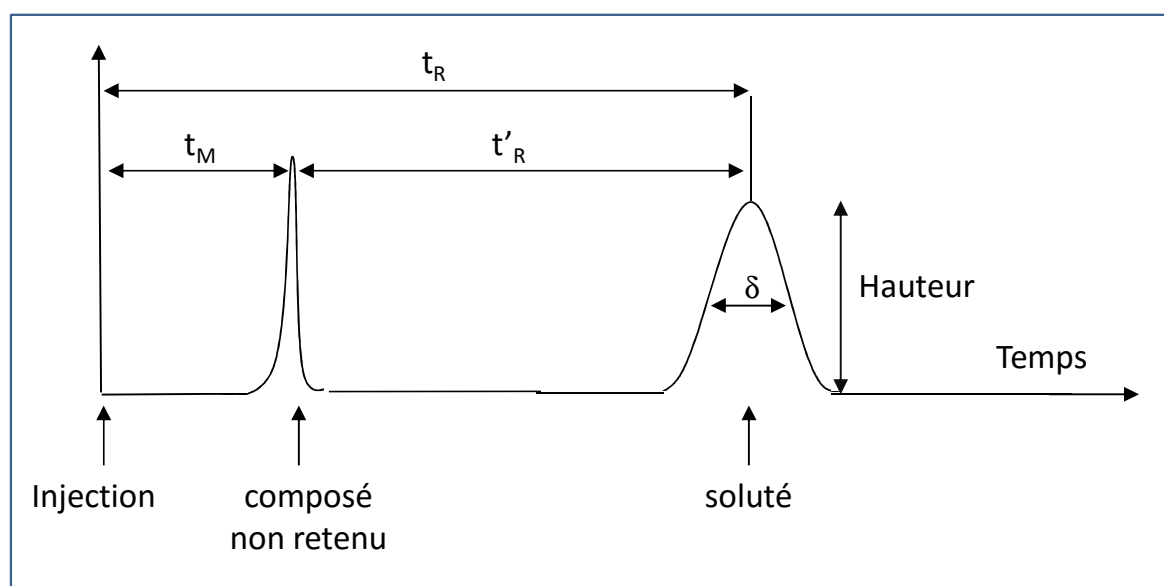


Figure II-4 : grandeurs de rétention en chromatographie

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) dépend des caractéristiques géométriques de la colonne (longueur, diamètre interne et épaisseur de phase stationnaire), de la nature du composé étudié, de la nature de la phase stationnaire, du débit du gaz vecteur et de la température lors de l'élution.

La HEPT est déterminée en calculant le ratio :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N} \quad (\text{équation II-4})$$

Avec L la longueur de la colonne.

Ainsi, l'efficacité d'une colonne chromatographique peut être déterminée en calculant la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT). L'efficacité de la colonne est maximale lorsque la HEPT est minimale, c'est-à-dire lorsque le nombre de plateaux N est maximal.

2.2.3.2) Théorie cinétique et équation de Van Deemter - Golay

Contrairement à la théorie des plateaux, la théorie cinétique prend en compte le temps pris par le soluté pour être à l'équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile. Dans cette théorie, la forme d'un pic chromatographique (élargissement et rétrécissement) peut donc être affectée par le débit de la phase mobile, ainsi que par d'autres facteurs concernant la diffusion des solutés au sein de la phase stationnaire.

En utilisant la théorie cinétique et en considérant les différents mécanismes qui contribuent à la forme d'un pic chromatographique, on obtient alors l'équation de Van Deemter - Golay :

$$\text{HEPT} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (\text{équation II-5})$$

Avec u la vitesse d'écoulement ou vitesse du gaz vecteur (en cm.s⁻¹), et A, B et C des constantes fonctions, respectivement, de la diffusion turbulente, de la diffusion longitudinale, et de la résistance aux transferts de masse.

La HEPT minimale correspond au débit optimal (u_o) pour lequel l'efficacité de la colonne est maximale (figure II-5).

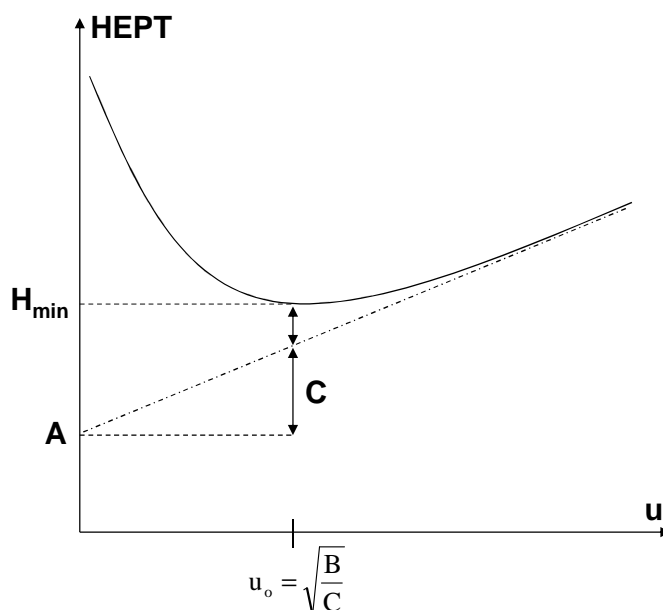


Figure II-5 : Courbe de Van Deemter-Golay typique

2.2.3.3) Détermination de la vitesse optimale de la phase mobile

Dans le but de maximiser l'efficacité de la colonne, nous avons donc déterminé la vitesse optimale de la phase mobile. Ce paramètre a été déterminé en cherchant la valeur minimale de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT).

Nous avons calculé la HEPT en utilisant la formule :

$$HEPT = \frac{L}{N'} \quad (\text{équation II-6})$$

La HEPT a été ensuite représentée graphiquement en fonction de la vitesse du gaz vecteur pour fournir des courbes de Van Deemter - Golay pour trois acides aminés : l'alanine, la leucine et la phénylalanine. Chaque mesure a été réalisée trois fois afin d'assurer une précision satisfaisante. L'efficacité maximale obtenue pour les trois acides aminés l'a été pour une vitesse du gaz vecteur de 37 cm.s^{-1} , ce qui correspond à un flux de $1,1 \text{ mL.min}^{-1}$ (figure II-6). L'utilisation de ce flux pour toutes les expériences au cours de cette thèse a permis d'assurer une séparation efficace de tous les acides aminés, sans compromettre la rapidité de l'analyse. Ainsi, l'hélium (pur à 99.999%) a été utilisé comme gaz vecteur à un flux constant de $1,1 \text{ mL.min}^{-1}$ en mode compensation de vide.

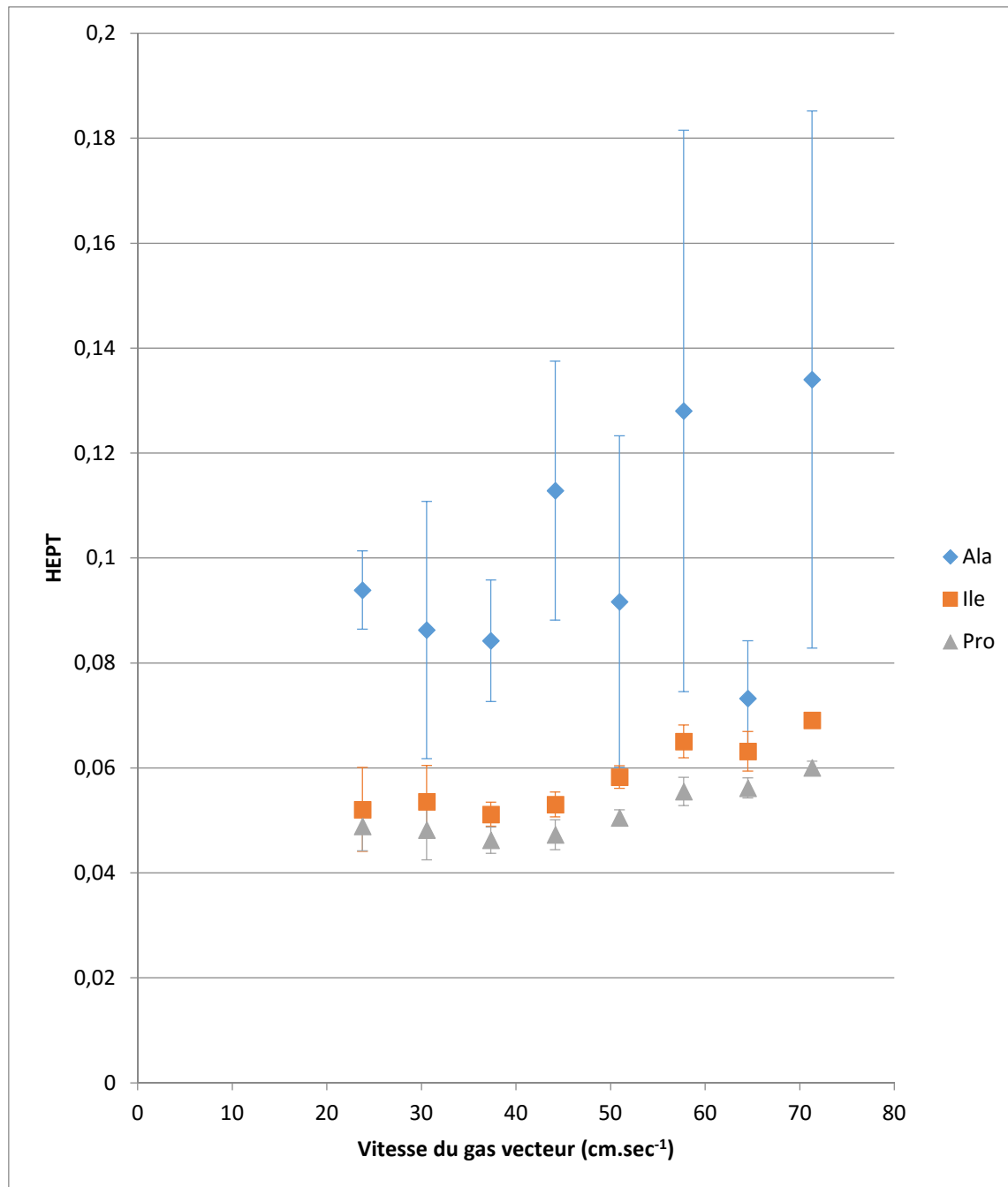


Figure II-6 : Courbe de Van Deemter – Golay obtenue pour l’alanine, l’isoleucine et la proline

2.2.3.4) Séparation chromatographique et détection des acides aminés

La figure II-7 montre un chromatogramme typique obtenu après injection d’un échantillon de la solution standard d’acides aminés, en mode « Total Ion Count » (TIC). Dans ce cas précis, l’échantillon d’acides aminés a été préparé en prélevant 100 µL à partir de la solution standard (concentration de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M). Cette solution a été évaporée puis

fonctionnalisée à 75°C pendant 15 minutes avec une mixture de MTBSTFA/DMF (respectivement, 60 μL / 20 μL). 0,5 μL de cette solution est injectée dans le CPG-SM.

Un autre mode de quantification que le TIC peut être employé : c'est le mode « Mass Range » (MR). Dans ce mode, un filtre est appliqué, ne montrant sur le chromatogramme que les pics correspondant aux substances comportant le rapport m/z choisi. Ce rapport choisi est le pic majoritaire du spectre de masse de l'acide aminé recherché. Ce mode permet d'identifier / quantifier des acides aminés qui ne sont pas en quantité suffisante pour apparaître au-dessus de la ligne de base en mode TIC.

A ces quantités de matière, l'ensemble des acides aminés ont été détectés et séparés en utilisant les conditions chromatographiques précédemment sélectionnées. Aucun des acides aminés ne co-élue. Typiquement, les acides aminés sont majoritairement élués dans l'ordre croissant de la masse molaire de leurs dérivatifs, avec cependant quelques permutations (tableau II-1). Des composés présents lors de la réaction de fonctionnalisation ont produit quelques contaminants non identifiés. Cependant, ces contaminants n'ont pas interféré avec l'analyse.

Il est intéressant de noter que le contaminant X (t_r = 20,65 min) est présent dans l'ensemble des chromatogrammes obtenus au cours de cette thèse. Dans ce chromatogramme, il est identifié comme étant le tris(triméthylsilyl)borate, avec un SI de 583, un RSI de 642, et une probabilité de 53,99%. Le SI est un facteur de correspondance directe pour le composé inconnu et le spectre de la librairie NIST. Le RSI est un facteur de correspondance de recherche inverse, ignorant tout pic de la substance inconnue qui n'est pas dans le spectre de la librairie. La probabilité est un facteur basé sur les différences entre les identifications adjacentes proposées par la librairie et ordonnées selon le SI. Avec le SI et le RSI, une correspondance parfaite équivaut à une valeur de 1000. Une valeur supérieure à 900 représente une excellente correspondance, entre 900 et 800, une bonne correspondance, et entre 800 et 700, une correspondance acceptable. En dessous de 600, cela correspond à une correspondance médiocre. Le facteur de probabilité est un paramètre complexe basé sur le facteur de correspondance SI et sur la différence entre des propositions de substances adjacentes. Si une substance proposée a un facteur SI supérieur à 900, et que la substance proposée suivante a un SI de 300, la probabilité d'une identification correcte est forte. Inversement, si plusieurs substances sont proposées avec des SI faibles, la probabilité d'une identification correcte est faible.

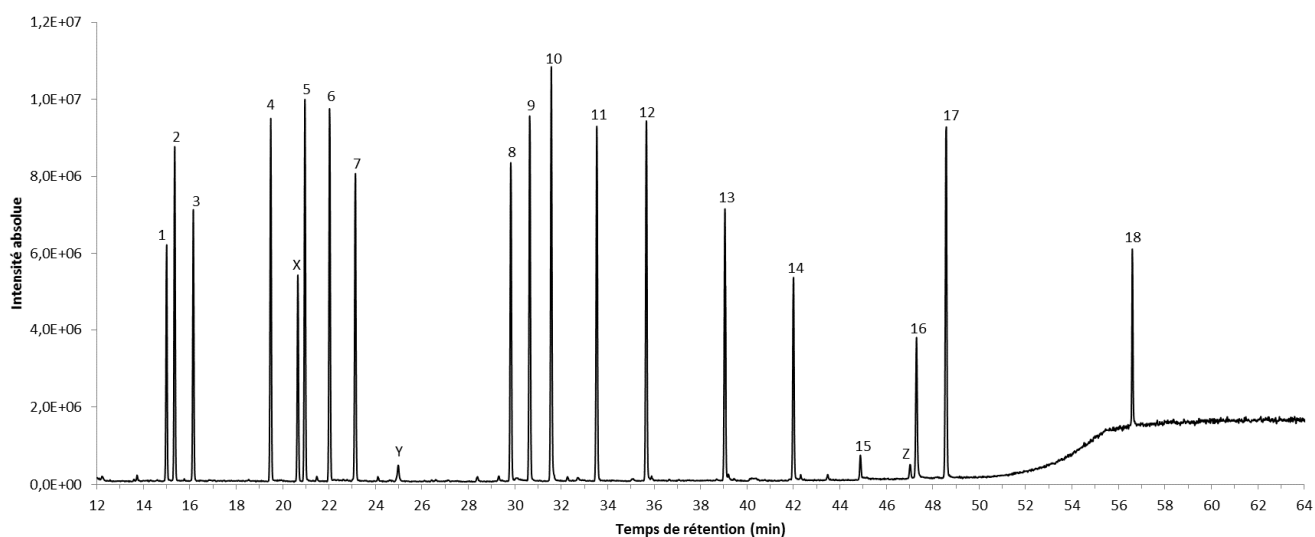


Figure II-7. Exemple d'analyse chromatographique de la solution standard (volume prélevé 100 μ L), montrant les acides aminés séparés. Fonctionnalisation avec 60 μ L de MTBSTFA, 20 μ L DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μ L du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, ratio de split 1/20, source du MS à 200°C, colonne 120°C 10 min, rampe 3°C/min jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C/min jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C. Gamme de détection, m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Arg, 16: L-His, 17: L-Tyr, 18: L-Cys. X, Y, Z : pics non identifiés.

2.2.4) La détection et l'identification par spectrométrie de masse

2.2.4.1) Le spectromètre de masse

Le spectromètre utilisé au cours de cette thèse est un DSQ II de la société ThermoElectron. L'analyseur de ce spectromètre de masse est un analyseur quadrupolaire. Il a été essentiellement utilisé en mode TIC (Total Ion Count) pour une gamme de rapports masse sur charge (m/z) variant de 50 à 650 u, avec une énergie de collision de 70 eV. Le rapport masse sur charge (m/z) est le rapport de la masse d'un ion sur sa charge, dont l'unité utilisée ici sera l'« unité de masse atomique unifiée », de symbole « u ».

Le principe d'un spectromètre de masse est (1) d'ioniser les molécules par impact électronique au sein de la source d'ions, (2) de les séparer en fonction de leur masse dans un

analyseur utilisant un champ magnétique et électrique, puis (3) de quantifier les ions par la mesure d'un courant électrique, au sein d'un détecteur.

L'ionisation est réalisée dans la source d'ions, ou chambre d'ionisation. Il est important que cette chambre soit sous vide, afin d'éviter la collision des ions produits avec les molécules présentes dans l'air. L'échantillon vaporisé provient de la colonne du GC, et les molécules sont bombardées par un flux d'électrons, entraînant la perte d'un électron (parfois deux) et donc la production d'un ion positif (figure II-8).

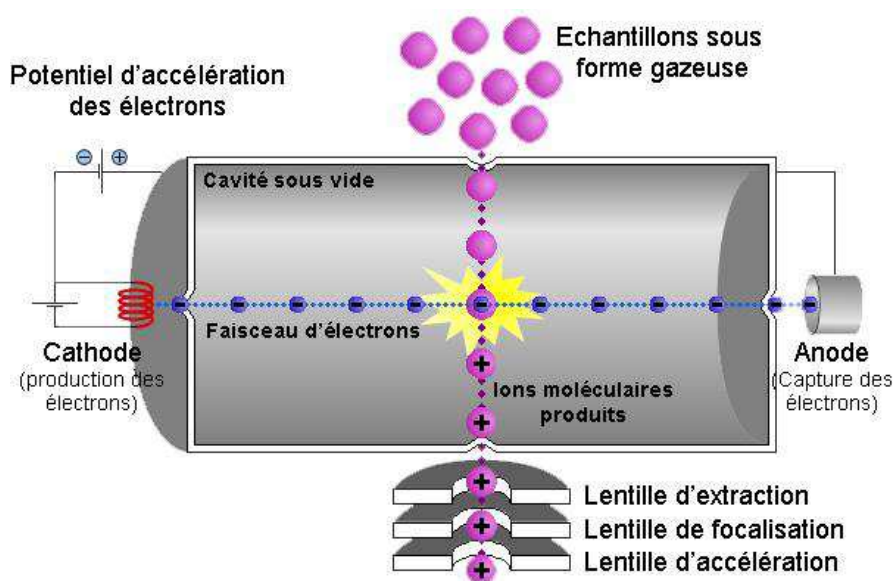


Figure II-8 : principe de la formation d'ions par bombardement électronique dans la source d'ions

Ces ions sont ensuite accélérés par leur passage à travers des lentilles, et séparés en fonction de leur masse et de leur charge, grâce à un champ électrique et à la déflexion causée par un champ magnétique. Ces deux facteurs sont exprimés à travers le rapport masse sur charge (m/z). La plupart des ions sortant du spectromètre de masse possèdent une charge de +1, ainsi dans la plupart des cas, le rapport masse sur charge sera le même que la masse molaire de l'ion.

Lorsqu'un ion arrive dans le détecteur, sa charge est neutralisée par un électron présent dans le détecteur. Cet électron sera alors remplacé par un autre. Le flux d'électrons dans le détecteur est détecté en tant que courant électrique, amplifié et enregistré. Plus il y a d'ions qui arrivent dans le détecteur, plus le courant est fort, et plus le signal est important.

Les pics d'un spectre de masse correspondent au courant produit par les ions de rapports m/z variés, et donc de leur abondance.

Dans le cas du DSQ II, la séparation des ions est réalisée grâce à un quadrupôle. Le quadrupôle est un analyseur qui consiste en quatre électrodes idéalement hyperboliques (mais en pratique cylindriques) et parallèles, entre lesquelles un champ électrique est créé. Les électrodes adjacentes possèdent une polarité opposée. Deux cylindres opposés ont un potentiel de $(U+V\cos(\omega t))$ et les deux autres ont un potentiel de $-(U+V\cos(\omega t))$, U étant un courant continu et $V\cos(\omega t)$ étant un courant alternatif (ω correspondant à la période. Multipliée par le temps, elle correspond à la fréquence de la rotation). Les tensions appliquées aux électrodes affectent ainsi la trajectoire des ions qui oscillent de manière hélicoïdale entre les électrodes. Pour des tensions continues et alternatives données, seuls les ions de certains rapports m/z pourront entrer en résonance et passeront à travers le filtre quadrupolaire, et tous les autres seront éjectés de la trajectoire originale (figure II-9). Ces mouvements sont décrits par des équations appelées les équations de Mathieu. Un spectre de masse est obtenu en mesurant l'abondance des ions passant à travers le quadrupôle en fonction de la variation des tensions appliquées aux électrodes. Il est ainsi possible de d'effectuer une détection en fonction d'un rapport m/z particulier (Single ion Monitoring, SIM), ou en balayant une gamme entière de rapports m/z (TIC).

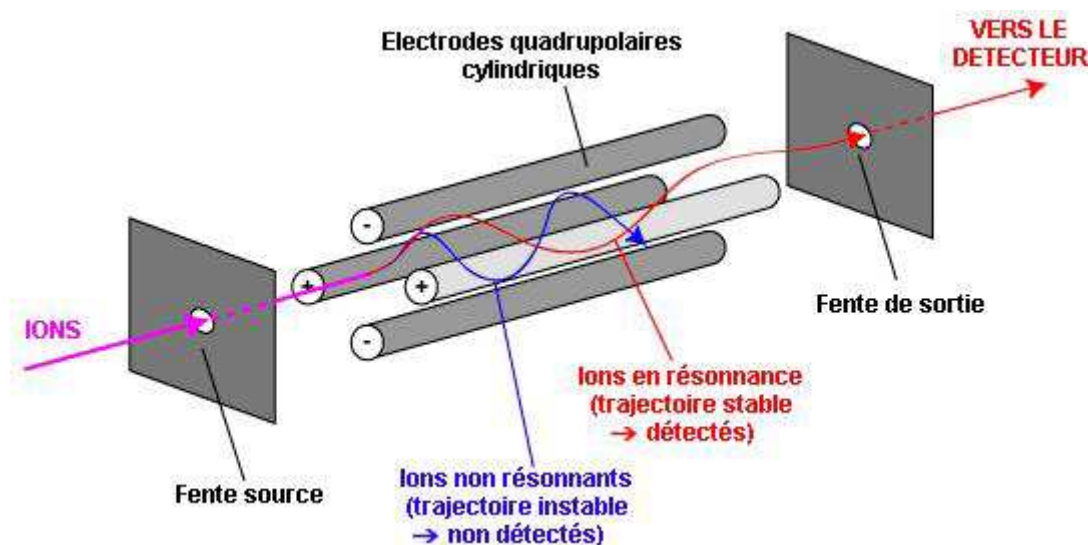


Figure II-9 : principe de l'analyseur quadrupolaire

2.2.4.2) Librairie de masses spectrales et informations structurales sur les dérivatifs

Le remplacement d'un hydrogène actif par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (tBDMS) ajoute une masse moléculaire de 114 g.mol⁻¹ à la masse molaire de l'acide aminé (M) (Stenerson, 2007). Nous pouvons observer sur les spectres de masse des acides aminés fonctionnalisés que l'hydrogène actif de chaque groupement COOH est systématiquement remplacé par un groupement tBDMS ; et qu'un seul hydrogène actif est remplacé au sein de chaque groupement NH₂. En effet, la taille du groupement tBDMS empêche la silylation multiple des atomes d'azote (Neves and Vasconcelos, 1987). Tous les dérivatifs après fonctionnalisation au MTBSTFA possèdent un schéma de fragmentation similaire et caractéristique, et les fragments obtenus sont bien documentés (voir par exemple Allen and Ratcliffe, 2009; Mawhinney *et al.*, 1986; Neves and Vasconcelos, 1987; Sparkman *et al.*, 2011; Stenerson, 2007). En effet, le spectre des dérivatifs *tert*-butyldiméthylsilylés des acides aminés, dû à l'impact électronique à 70eV, inclus souvent les cations typiques, utiles à l'identification, de rapports masse sur charge:

$$m/z = M_d - 57 \text{ u (perte d'un radical } ^\bullet\text{C}_4\text{H}_9\text{) ;}$$

$$m/z = M_d - 15 \text{ u (perte d'un radical } ^\bullet\text{CH}_3\text{) ;}$$

$$m/z = M_d - 85 \text{ u (perte de } ^\bullet\text{C}_4\text{H}_9 \text{ suivi par la perte d'une molécule de CO) ;}$$

$$m/z = M_d - 159 \text{ u (perte d'un radical } ^\bullet\text{C(O)-O-tBDMS) ;}$$

ainsi que $m/z = M_d - R = 302 \text{ u}$ (perte de la chaîne latérale R, de masse molaire variant selon les acides aminés. Le fragment restant, de formule constante d'un acide aminé à l'autre, est systématiquement de rapport $m/z = M_d - R = 302 \text{ u}$).

Avec M_d la masse molaire de l'acide aminé fonctionnalisé.

Le pic d'ion moléculaire $m/z = M_d$ peut être présent mais est en général très faible. La figure II-10 montre un exemple de ce schéma de fragmentation pour la tBDMS-valine, avec son spectre de masse ($M_d = 345 \text{ u}$). La fragmentation de la tBDMS-valine représente le plus simple modèle observé.

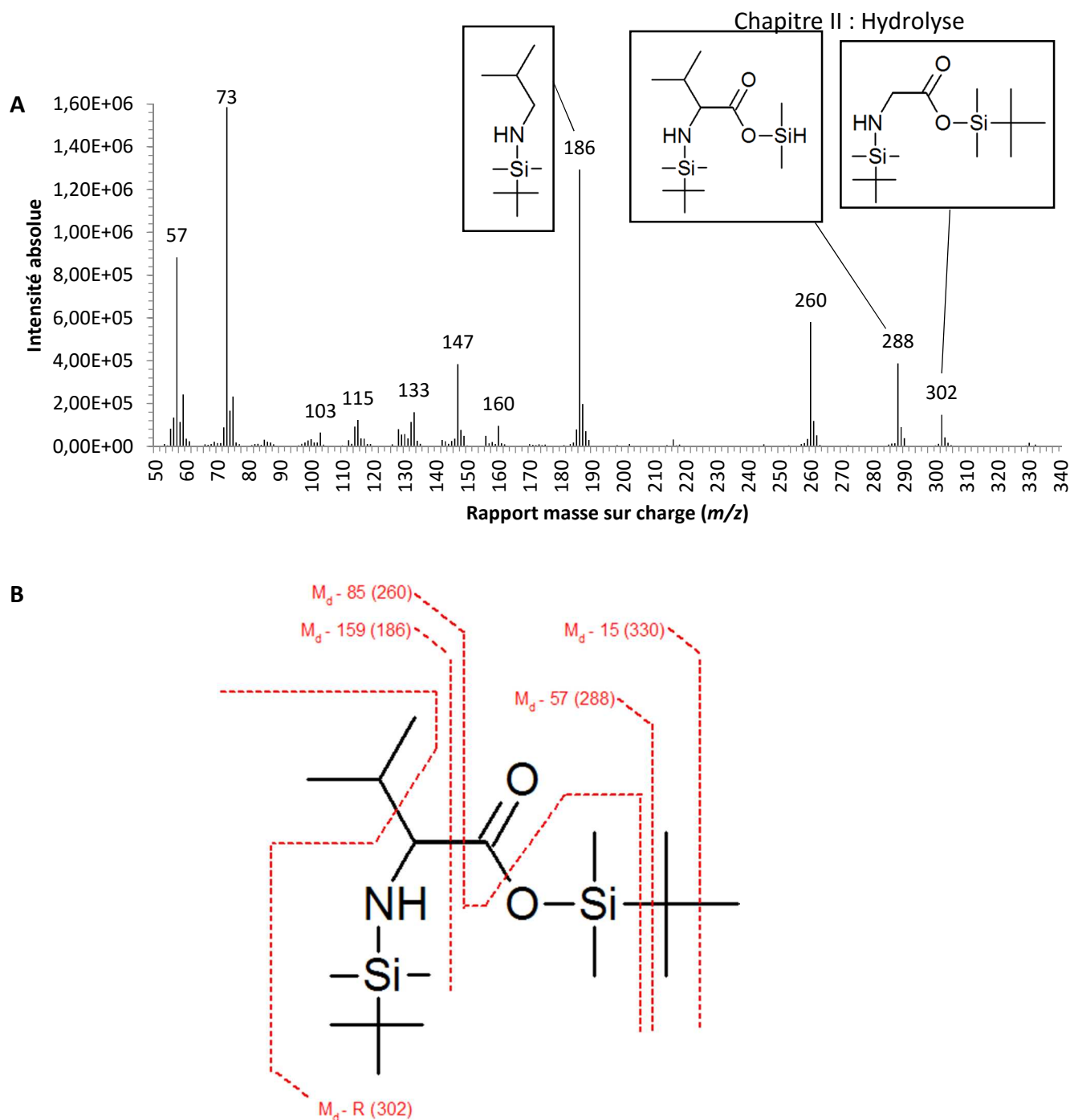


Figure II-10. (A) Spectre de masse de la tBDMS-Valine ($M_d = 345$ u), avec présentation de la formule de quelques fragments ; et (B) le schéma de fragmentation proposé pour expliquer le spectre de masse observé (énergie de collision: 70 eV)

Le tableau II-1 résume les différents rapports m/z pouvant être attendus de la fragmentation de chaque acide aminé.

t_R (min)	Acide aminé	M (g.mol ⁻¹)	Nombre de H remplacés	M_d (g.mol ⁻¹)	Fragments massiques (m/z) attendus, en u				
					M_d-15	M_d-57	M_d-85	M_d-159	M_d-302
15,32	Alanine	89	2	317	302	260	232	158	15
16,13	Glycine	75	2	303	288	246	218	144	1
19,45	Valine	117	2	345	330	288	260	186	43
20,92	Leucine	131	2	359	344	302	274	200	57
22,00	Isoleucine	131	2	359	344	302	274	200	57
23,10	Proline	115	2	343	328	286	258	184	41
29,80	Methionine	149	2	377	362	320	292	218	75
30,62	Serine	105	3	447	432	390	362	288	145
31,53	Threonine	119	3	461	446	404	376	302	159
33,49	Phenylalanine	165	2	393	378	336	308	234	91
35,63	Aspartic acid	133	3	475	460	418	390	316	173
39,03	Glutamic acid	147	3	489	474	432	404	330	187
41,96	Lysine	146	3	488	473	431	403	329	186
44,88	Arginine	174	3	499	484	442	414	340	197
47,28	Histidine	155	3	497	482	440	412	338	195
48,52	Tyrosine	181	3	523	508	466	438	364	221
56,57	Cystine	240	4	696	681	639	611	537	394

Tableau II-1 : différents fragments massiques attendus de la fragmentation des acides aminés silylés, avec la masse molaire de l'acide aminé (M), le nombre de H remplacés par un groupement tBDMS (source : NIST) et la masse molaire du dérivatif silylé (M_d) (énergie de 70 eV)

D'importants pics à $m/z = 57$ u, $m/z = 73$ u et $m/z = 147$ u sont aussi présents dans tous les spectres de masse.

Le pic à $m/z = 57$ u peut être attribué au radical $\cdot C_4H_9$. Il est intéressant de remarquer que les fragments à 57 u sont en théorie attendus pour la leucine et l'isoleucine (tableau II-1).

Le pic à $m/z = 73$ u a également été observé dans tous les spectres de masse en tant que pic de base par Neves et Vasconcelos (1987). Les auteurs observent également le pic à $m/z = 147$ u comme étant généralement très intense. Pour les auteurs, ce pic est caractéristique du groupement tBDMS et correspond à l'ion $CH_3O-TBDMS, H^+$; et il semble résulter d'une réaction de réarrangement. Selon Moldoveanu et David (2002), les réarrangements accompagnant la fragmentation sont communs lors de l'ionisation des composés silylés. Un exemple de ce type mécanisme est le réarrangement d'un groupement TMS vers un groupement insaturé (tel que $=O$) plus un clivage β (réarrangement de McLafferty) (Moldoveanu and David, 2002).

Les pics à $m/z = 73$ u et $m/z = 147$ pourraient également être attribués aux ions $(CH_3)_3Si^+$ et $(H_3C)_3Si-O^+=Si(CH_3)_2$, respectivement (Moldoveanu and David, 2002). Cependant,

les auteurs ont observés ces pics après analyse de dérivatifs triméthylsilylés et non *tert*-butyldiméthylsilylés.

Un pic à $m/z = 207$ u apparaît dans les spectres de masse des acides aminés éluant à la fin de l'analyse (voir par exemple la cystine), et peut être attribué au bleeding de la colonne, correspondant à un ion contenant de multiples atomes de silicone (Sparkman *et al.*, 2011).

Tous les analytes ont été facilement identifiés grâce à leurs fragments cationiques majeurs et ont été quantifiés en utilisant le laurate de méthyle comme étalon interne. Les principaux fragments des dérivatifs sont donnés dans le tableau II-2. Ces résultats correspondent au chromatogramme présenté au paragraphe 2.2.3.4 (figure II-6). Certains de nos résultats expérimentaux ont été ajoutés à la librairie pré-existante de masses spectrales NIST (National Institute of Standards and Technology) pour tous les dérivatifs d'acides aminés.

N° du pic (fig. II-7)	Acide aminé	t_R (min)	M_d (g.mol ⁻¹)	Fragments massiques (m/z) en u, classés par ordre décroissant de leurs intensités relatives (entre parenthèses)
2	Alanine	15,36	317	73(100) 158 (77) 57(61) 232(44) 147(40) 260 (23) 302 (1)
3	Glycine	16,15	303	73(100) 147(64) 57(56) 218 (52) 246 (34) 144 (13) 288 (1)
4	Valine	19,49	345	73(100) 186 (82) 57(56) 260 (37) 288 (24) 147(24) 302(9) 330 (1)
5	Leucine	20,96	359	200 (100) 73(94) 57(61) 274 (33) 302 (24) 147(21)
6	Isoleucine	22,02	359	73(100) 200 (99) 57(70) 302 (38) 274 (38) 147(24) 344(1)
7	Proline	23,14	343	184 (100) 73(84) 57(40) 258 (26) 286 (16) 147(16) 328 (1)
8	Methionine	29,82	377	73(100) 218 (40) 57(36) 292 (34) 75 (25) 147(24) 320 (22) 170(9) 244(8) 362 (1) 302(1)
9	Serine	30,64	447	73(100) 57(29) 288 (17) 390 (15) 362 (15) 147(11) 302(8) 432 (1)
10	Threonine	31,57	461	73(100) 57(23) 302 (14) 159 (13) 404 (7) 147(7) 376 (5)
11	Phenylalanine	33,53	393	73(100) 91 (40) 302(40) 57(38) 234 (33) 308 (22) 147(19) 336 (17) 378 (1)
12	Aspartic acid	35,67	475	73(100) 57(21) 302(14) 418 (11) 147(10) 316 (7) 390 (6) 244(4) 173 (1)
13	Glutamic acid	39,05	489	73(100) 57(17) 432 (16) 330 (12) 147(12) 272(11) 404 (2) 474 (1) 302(1)
14	Lysine	42,01	488	73(100) 198(15) 300(13) 147(9) 272(6) 329 (4) 431 (2) 302(1) 186 (1)
15	Arginine	44,88	499	73(100) 340 (14) 57(13) 442 (13) 184(10) 414 (1) 484 (1) 197 (1)
16	Histidine	47,30	497	73(100) 196(57) 57(23) 440 (19) 338 (12) 195 (11) 147(5) 198(4) 482 (1) 412 (1)
17	Tyrosine	48,59	523	73(100) 302(62) 57(17) 147(11) 221 (9) 364 (5) 466 (5) 438 (3) 508 (1)
18	Cystine	56,59	696	73(100) 207(38) 302(19) 348(17) 147(17) 188(15) 258(14) 639 (3) 537 (1)

Tableau II-2 : temps de rétention (t_R), masse molaire du dérivatif (M_d) et pics caractéristiques des spectres de masse des acides aminés silylés ; correspondant à la figure II-7. Les rapports m/z en gras sont ceux qui sont attendus en théorie (*cf.* figure II-10 et tableau II-1).

Pour certains acides aminés, les fragments attendus d'après le schéma de fragmentation théorique sont présents à une très faible intensité dans le spectre de masse, et ces fragments ne peuvent donc pas être utilisés pour identifier l'acide aminé. D'autres fragments doivent être utilisés à la place. C'est le cas par exemple pour la cystine, dont le pic à $m/z = 348$ u, non attendu en théorie (*cf.* tableau II-1) est causé par la rupture du pont disulfure (Neves and Vasconcelos, 1987).

Un autre exemple, l'arginine, présente des difficultés dans la prédiction du schéma de fragmentation (Allen and Ratcliffe, 2009). L'un des dérivatifs possibles de l'arginine possède une masse molaire de 499 u, au lieu de 516 u (masse molaire du dérivatif attendue suite au remplacement de ses trois hydrogènes labiles), par le clivage du groupement amine à partir du groupement guanido ($\text{H}_2\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)(\text{NH})$) (Allen and Ratcliffe, 2009) (figure II-13). En utilisant cette masse molaire de 499 u comme masse molaire du dérivatif de l'arginine (M_d), au lieu de 516 u, nous retrouvons ensuite dans le spectre de masse les groupements prédits par le schéma de fragmentation habituel (*cf.* tableaux II-1 et II-2). Nous reviendrons par la suite plus en détail sur la difficulté de détection de cet acide aminé (*cf.* paragraphe 2.3.1).

Dans l'exemple discuté ici, l'arginine (pic numéro 15 de la figure II-6) n'est pas identifiée en tant que telle par la librairie NIST, mais on retrouve bien ses fragments caractéristiques dans le spectre de masse. Ceci est probablement dû à la faible quantité détectée, comparativement aux autres acides aminés. Nous verrons par la suite que l'injection d'une quantité plus faible d'acides aminés entraînera la non-détection de l'arginine, ainsi que d'autres acides aminés, et nous en proposerons une explication (*cf.* paragraphe 2.3.1).

2.2.5) L'hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est utilisée pour rechercher des molécules organiques, notamment des acides aminés, dans les météorites. Cependant, les acides aminés pourraient être dégradés lors de la procédure d'hydrolyse. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse. Nous avons donc analysé une quantité connue d'acides aminés. Nous avons ensuite analysé la même quantité, ayant précédemment été soumise à une hydrolyse acide. Puis nous avons comparé les résultats obtenus lors de ces deux expériences.

2.2.5.1) Protocoles d'analyse de la solution de référence et de la solution hydrolysée

2.2.5.1.1) La référence

Un volume de 10 μL de la solution standard d'acides aminés est ajoutée à un vial et évaporée à 40°C, sous flux constant d'argon, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. L'échantillon est alors prêt pour la fonctionnalisation puis analyse. Le résultat de cette analyse est utilisé comme référence.

2.2.5.1.2) L'hydrolyse

Nous étudions ici l'hydrolyse en phase liquide, réalisée avec une concentration en HCl de 6M, à 100°C pendant 24 heures, sous atmosphère inerte d'argon.

a) Protocole n°1 : HCl 6M, 100°C, 24h

Etape 1 : 10 μL de la solution standard d'acides aminés est ajoutée à un vial et évaporée à 40°C, sous flux constant d'argon, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. 1 mL de HCl à 6M est ajouté, et le vial est fermé hermétiquement d'un bouchon comportant un septum en polytétrafluoroéthylène (PTFE), à l'aide d'une pince à sertir. Afin d'éviter l'oxydation au cours de l'hydrolyse, l'air est chassé du vial et remplacé par une atmosphère inerte d'argon. Pour ce faire, nous faisons circuler de l'argon dans le vial, à travers le septum, pendant 5 minutes.

Etape 2 : Le vial est ensuite placé au four, à une température de 100°C, pendant 24h. Le vial est ensuite ouvert, et la solution est évaporée à 60°C, sous un flux d'argon, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

Etape 3 : Ce résidu est dissout dans 1 mL de HCl 0.1M afin de relever le pH à la même valeur que celle de la solution d'acides aminés de référence. La solution est évaporée à nouveau avant l'étape de fonctionnalisation.

Un blanc (protocole identique, sans les acides aminés) a également été réalisé.

b) Protocole n°2 : HCl 6M, température ambiante, 0h (contact rapide avec une solution de HCl 6M)

Dans le but d'étudier l'effet d'un contact rapide de la solution d'acides aminés avec une solution d'acide (HCl 6M), la même procédure a été testée, cette fois sans l'étape 2

(chauffage à 100°C pendant 24h). Le HCl 6M a été évaporé immédiatement après l'addition à la solution d'acides aminés. Le reste du protocole est identique au protocole n°1.

c) Protocole n°3 : HCl 6M, 100°C, 24h, avec addition de fluorovaline

Dans le but de vérifier l'influence des sels (précipités au cours de l'évaporation) sur la fonctionnalisation, nous avons testé le protocole n°1 en gardant exactement la même procédure, avec l'ajout d'une quatrième étape : l'ajout d'une solution de fluorovaline, après l'étape 3. Le vial est ensuite séché sous un flux d'argon, dissous dans 1 mL de HCl 0,1M, séché, puis fonctionnalisé et analysé.

En effet, si la raison d'un recouvrement inférieur à 100% des acides aminés (comparaison entre la référence et l'expérience) est la dégradation des acides aminés lors de leur contact avec le HCl 6M, le fait d'ajouter la fluorovaline après ce contact devrait entraîner une réduction des quantités pour l'ensemble des acides aminés, sauf pour la fluorovaline.

Cependant, dans le cas où la réduction des quantités est due à la présence de sels lors de la réaction de fonctionnalisation, la fluorovaline, étant un acide aminé, et de fait possédant des groupements fonctionnalisables, devrait voir son rendement de fonctionnalisation affecté de la même manière que les autres acides aminés.

2.2.5.2) Protocole de fonctionnalisation et d'injection

Après addition des réactifs de fonctionnalisation au résidu sec (10 µL de DMF et 20 µL de MTBSTFA), les vials sont chauffés à 75°C pendant 15 minutes. Les dérivatifs volatils *tert*-butyldiméthylsilyle (tBDMS) résultants sont alors analysés par CPG-SM. 20 µL d'une solution de méthyl laurate (étalon interne) à 10^{-3} M est systématiquement ajoutée à chaque échantillon, après la fonctionnalisation. 0,5 µL de la solution d'acides aminés fonctionnalisés sont alors injectée dans le CPG-SM.

2.3) Résultats et interprétations

Pour notre étude, une analyse semi-quantitative des acides aminés est suffisante. En effet, nous avons seulement comparé les effets de la procédure d'hydrolyse à une solution standard d'acides aminés qui ne subit pas d'hydrolyse (référence). Pour chaque acide aminé présent dans la solution standard (référence), nous pouvons considérer que le rendement de la réaction de fonctionnalisation est proche de 100% (Rodier *et al.*, 2001).

Suite à l'analyse de la référence, nous mesurons le ratio de l'aire du pic chromatographique de chaque acide aminé sur l'aire du pic chromatographique de l'étalon interne.

Nous réalisons la même chose pour chaque acide aminé suite à l'expérience.

La comparaison de ces deux ratios (référence contre expérience) nous permet de déterminer le pourcentage de perte (et par déduction le pourcentage de recouvrement) de chaque acide aminé.

En effet, en comparant les quantités d'acides aminés mesurés suite à l'analyse de la référence et de l'hydrolyse, nous pouvons calculer un pourcentage de perte, selon la formule suivante :

$$\% \text{ perte} = \frac{Q_{\text{ref}} - Q_{\text{hydrolyse}}}{Q_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{équation II-7})$$

Avec Q_{ref} la quantité d'acides aminés mesurée lors de l'analyse de la référence, et $Q_{\text{hydrolyse}}$ la quantité d'acides aminés mesurée suite à l'hydrolyse acide.

Nous pouvons ensuite en déduire le recouvrement des acides aminés, selon la formule :

$$\% \text{ recouvrement} = 100 - \% \text{ perte} = \frac{Q_{\text{hydrolyse}}}{Q_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{équation II-8})$$

Pour rappel, la figure I-6 du chapitre I présente l'ensemble des acides aminés étudiés au cours de ce chapitre II.

2.3.1) Analyse du chromatogramme de référence

Sur la figure II-11, on présente le chromatogramme de l'analyse de la solution référence d'acides aminés, en mode Total Ion Count (TIC). Les ratios des aires des pics

chromatographiques des acides aminés sur l'aire du pic chromatographique de l'étalon interne ont été déterminés, afin de pouvoir comparer ces valeurs avec celles obtenues lors des protocoles d'hydrolyse. Quinze des dix-sept acides aminés ont été détectés en utilisant les conditions chromatographiques précédemment sélectionnées.

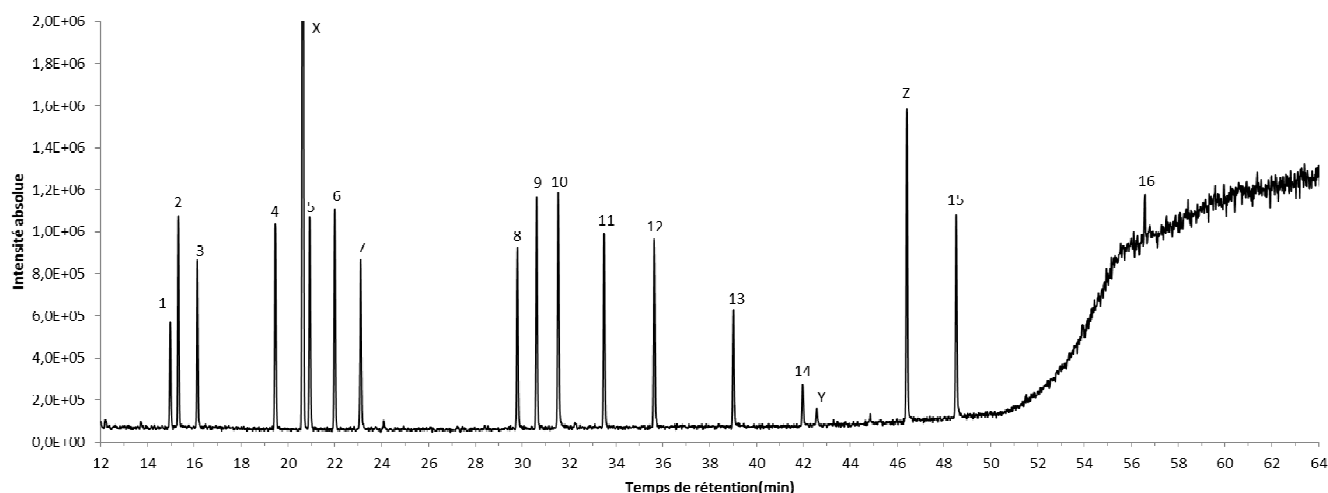


Figure II-11. Analyse chromatographique de la solution de référence (volume prélevé 10 μ L), montrant les acides aminés séparés. Fonctionnalisation avec 10 μ L MTBSTFA, 20 μ L DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μ L du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, détecteur 200°C, programme de température du four : isotherme 10 min à 120°C, rampe 3°C/min jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C/min jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C. Gamme de détection, m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Tyr, 16: L-Cys. X, Y, Z : pics non identifiés.

Compte tenu de leur structure et de leur poids moléculaire, certains acides aminés sont difficilement élués. Quand ils le sont, on observe un fort élargissement du pic chromatographique du fait de la diffusion longitudinale dans la colonne chromatographique. La diffusion longitudinale correspond à la diffusion du soluté dans la phase gazeuse. Cette diffusion est due à la dispersion des molécules dans la phase mobile, des régions les plus concentrées aux régions les plus diluées. Cette dispersion se fait au fur et à mesure de l'avancement dans la colonne. La largeur de la bande (zone d'élution) augmente au cours du déplacement dans la colonne et cela se répercute sur la largeur du pic du chromatogramme (figure II-12) (Freissinet, 2010). Or, un fort élargissement / déformation du pic

chromatographique induit une augmentation de la valeur de la limite de détection et donc de quantification des composés en question.

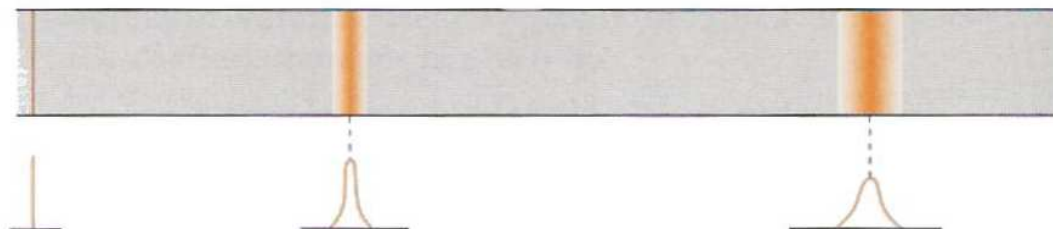


Figure II-12 : représentation schématisée du phénomène de la diffusion longitudinale (dans Freissinet, 2010).

De plus, ces composés nécessitent souvent de fortes températures pour être élués. Or c'est aux fortes températures (supérieures à 250°C) que le « bleeding » de la colonne est le plus important, engendrant un fort bruit de fond susceptible, encore une fois, d'augmenter la valeur de limite de détection des composés cibles. Le bleeding est un bruit de fond généré par l'élution des produits de dégradation de la phase stationnaire de la colonne chromatographique. On peut voir par exemple sur la figure II-11 que ce dernier devient particulièrement important à partir d'environ 246°C (correspondant au temps de rétention de 52 minutes sur la figure II-11). La température de 250°C est atteinte à 53,3 minutes.

Une fois fonctionnalisés, l'histidine, l'arginine et la cystine font partie des acides aminés les plus lourds, avec respectivement une masse molaire de : 497 ; 499 et 696 g.mol⁻¹. Même une fois fonctionnalisés ces acides aminés restent peu volatils avec une forte affinité pour la colonne due à leurs importantes chaînes carbonées.

Pour toutes les raisons mentionnées plus avant, l'arginine et l'histidine n'ont été détectées dans aucun chromatogramme, et cela même en recherchant leurs fragments de masse caractéristiques en mode Mass Range (MR). La cystine, quant à elle, a toujours pu être détectée en TIC. Cependant l'intensité du pic ne permettait pas une quantification correcte. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser le mode mass range (MR) afin de la quantifier. Nous avons alors utilisé la masse m/z de 302 u, masse correspondant au pic de base de la cystine. Le dérivatif de la cystine, étant le plus lourd des dérivatifs d'acides aminés, est élué lorsque

le bleeding de la colonne est le plus important, son pic est donc en partie noyé dans la ligne de base. En conséquence, on observe que le pic de cystine possède une aire bien plus faible relativement aux autres acides aminés, et le mode MR a dû être utilisé pour la quantifier.

Une autre explication possible pour la non-détection de l'arginine et de l'histidine est que leur fonctionnalisation pourrait avoir généré plusieurs espèces chimiques différentes. Ceci aurait pu générer des pics multiples avec des aires plus faibles, ayant pour conséquence de rendre les dérivatifs plus difficiles à détecter car sous la limite de détection. Ces espèces peuvent être attribuées à une fonctionnalisation incomplète des acides aminés ou à un réarrangement des molécules en phase gazeuse (Freissinet *et al.*, 2010). Par exemple, l'histidine possède plusieurs groupements fonctionnalisables. Ainsi, en cas de fonctionnalisation incomplète, les dérivatifs de l'histidine peuvent être mono-, bi- ou tri-silylés. Si la fonctionnalisation de l'histidine est incomplète, deux ou trois dérivatifs pourraient co-exister, éluant à différents temps de rétention, et produisant différents spectres de masse avec des intensités relativement faibles, tombant ainsi sous les limites de détection de ces composés.

Les acides aminés basiques comme l'arginine, l'histidine et la lysine, sont connus pour être les plus difficiles à fonctionnaliser. Ils possèdent les plus faibles facteurs de réponse à la fonctionnalisation. Ils requièrent un temps de chauffage additionnel pour atteindre le rendement maximum de fonctionnalisation par silylation au MTBSTFA (Neves and Vasconcelos, 1987).

L'**arginine** semble être l'acide aminé le plus difficile à silyler complètement (Neves and Vasconcelos, 1987). Les auteurs avancent que la taille du groupement tBDMS empêche la silylation multiple des atomes d'azote (Neves and Vasconcelos, 1987), faisant sûrement référence aux multiples atomes d'azote du groupement guanido ($\text{H}_2\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)(\text{NH})$) (figure II-13), puisque, comme montré par comparaison des spectres de masses obtenus avec la librairie de masses spectrales de la NIST, seul un groupement tBDMS peut être ajouté par groupement amine. Les composés stériquement encombrés sont les plus difficiles à silyler (Moldoveanu and David, 2002). De plus cet acide aminé présente des difficultés dans la prédiction du schéma de fragmentation, suite à une fonctionnalisation au MTBSTFA (Allen and Ratcliffe, 2009).

Cet acide aminé est également connu pour produire plus d'un dérivatif dans le cas d'une fonctionnalisation au MTBSTFA incomplète. Par exemple, Mawhinney *et al.* (1986) ont observé la formation de deux pics différents pour l'arginine. Neves and Vasconcelos (1987) considèrent possible pour l'arginine une perte du groupement tBDMS-guanido, par réarrangement de McLafferty, conduisant à un ion de $m/z = 343$ u, suivi du schéma de fragmentation habituel. Dans le cas d'une fonctionnalisation incomplète, l'arginine est expérimentalement connue pour produire plus d'un dérivatif, en générant par exemple les dérivatifs 3S-tBDMS-arginine et 4S-tBDMS-arginine, avec des ratios m/z de 501 u et 631 u, respectivement (Öhlund and Näsholm, 2001). Comme précisé au paragraphe 2.2.4.2 (bibliothèque de masses spectrales et informations structurales sur les dérivatifs), Allen et Ratcliffe (2009) ont montré que l'un des dérivatifs possibles de l'arginine possédait une masse molaire de 499 g.mol⁻¹, par le clivage du groupement amine à partir du groupement guanido (Allen and Ratcliffe, 2009). Dans notre chromatogramme de référence, les produits de fragmentation de tous ces dérivatifs ont été recherchés, mais n'ont pas été trouvés.

Groupement guanidine

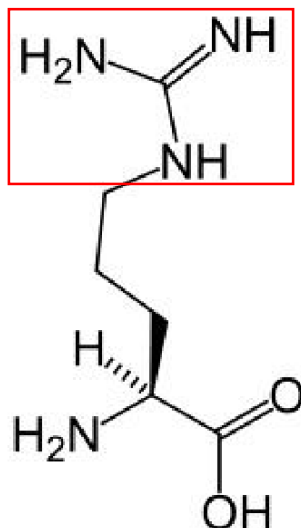


Figure II-13 : structure de l'arginine, montrant le groupement guanido (ou guanidine)

La difficulté de fonctionnalisation de l'**histidine** peut également être liée au fait que cet acide aminé possède un groupement beta-imidazole (figure II-14). Or il a été montré que les composés imidazole silylés sont eux-mêmes d'excellents donneurs de la fonction silyle (Mawhinney *et al.*, 1986). L'histidine est donc probablement facilement sujette à la

désilylation de son groupement imidazole silylé, limitant sa détection par CPG-SM. Et en effet, les réactions de silylation sont communément réversibles, le sens de déplacement de l'équilibre étant gouverné par des facteurs thermodynamiques (Moldoveanu and David, 2002).

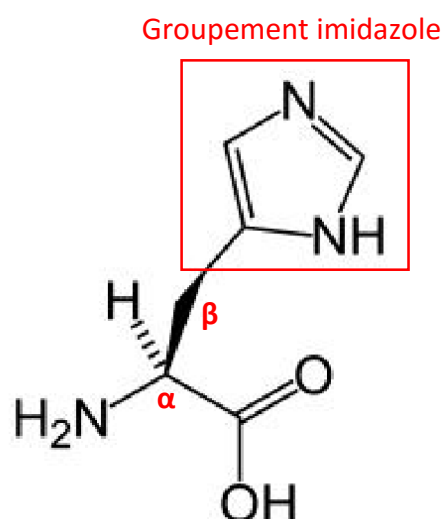


Figure II-14: structure de l'histidine, montrant le groupement imidazole lié au carbone bêta de l'acide aminé (le carbone alpha étant le carbone porteur des fonctions amine et carboxyle)

Mawhinney *et al.* (1986) ont montré que l'emploi de MTBSTFA contenant 1,0% de tBDMS-Cl (chlorure de silyle) empêchait la détection des acides aminés basiques (arginine et histidine), indiquant que le chlorure de silyle interférait avec leur fonctionnalisation. Ainsi, la présence d'ions Cl^- résultant de l'hydrolyse au HCl pourrait également expliquer dans notre cas la non-détection de ces deux acides aminés. Nous verrons par la suite (*cf.* paragraphes 2.4.2.1 et 2.4.2.2) que cette hypothèse possède des implications plus importantes.

En guise de remarque, l'arginine et l'histidine sont présents dans le chromatogramme de la figure II-7, car pour cette expérience, réalisée *a posteriori*, le volume prélevé de la solution standard était de 100 μL au lieu de 10 μL , ayant pour résultat que les quantités détectées ne tombent pas sous la ligne de base

2.3.2) Influence de la procédure d'hydrolyse sur les quantités d'acides aminés (protocole n°1)

Nous avons tout d'abord testé l'influence de l'hydrolyse acide en phase liquide (24 à 100°C) sous atmosphère inerte sur le recouvrement des acides aminés. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la dégradation des acides aminés libres pendant l'hydrolyse acide en phase liquide sous atmosphère inerte.

Le chromatogramme obtenu après hydrolyse est présenté en figure II-15. Les quinze acides aminés détectés lors de l'analyse de la référence sont toujours détectés ici.

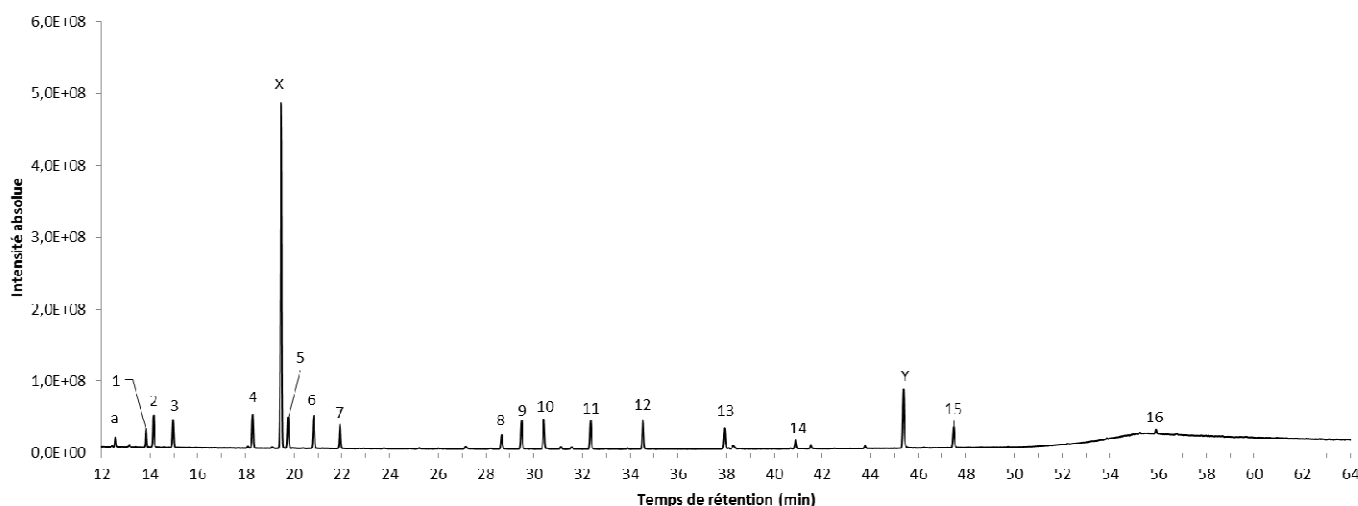


Figure II-15 : Analyse chromatographique de la solution hydrolysée selon le protocole n°1, montrant les acides aminés séparés. Fonctionnalisation avec 10 μ L MTBSTFA, 20 μ L DMF, 15 min à 75°C.

Injection de 0,5 μ L du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, source MS 200°C, colonne 120°C durant 10 min, rampe 3°C/min jusqu'à 250°C, puis deuxième rampe de 10°C/min jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C. Gamme de détection, m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Tyr, 16: L-Cys. A, X, Y : pics non identifiés.

Après mesure des ratios des aires des pics chromatographiques des acides aminés sur l'aire du pic de l'étalon interne, et comparaison de ces résultats (protocole n°1) avec ceux de la référence, nous pouvons observer que seul un acide aminés n'a subi aucune perte : la lysine.

Une réduction des quantités – ne pouvant être expliquée par la variabilité des résultats (c'est-à-dire que les écart-types de la référence et de l'hydrolyse ne se recoupent pas) – a été observée pour neuf acides aminés sur les 15 détectés : l'alanine, la valine (le moins affecté, 11.9%), la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, et la cystine (le plus affecté, 66.3%) (tableau II-3, figure II-16 et figure II-17).

Acide aminé	Référence		HCl 6M, 100°C, 24h			
	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Pourc. Perte	ETR (%)
Alanine	2,19	3,20	1,91	8,53	12,93	55,15
Glycine	1,64	4,15	1,60	5,46	2,23	266,30
Valine	2,23	3,54	1,96	3,08	11,89	30,46
Leu cine	2,43	3,14	1,98	5,36	18,40	24,61
Isoleucine	2,44	3,61	2,05	2,40	15,88	20,24
Proline	1,88	6,08	1,42	27,63	24,50	78,82
Methionine	1,90	5,37	0,96	11,93	49,39	12,04
Sérine	2,46	7,33	1,61	19,41	34,29	35,80
Thréonine	2,71	4,40	1,50	39,36	44,81	44,16
Phénylalanine	2,26	12,15	1,72	4,24	24,14	35,01
Acide aspartique	2,03	14,64	1,74	9,03	14,34	93,05
Acide glutamique	1,32	23,20	1,09	20,28	17,29	143,87
Lysine	0,60	19,88	0,62	26,87	-3,33	-927,51
Tyrosine	1,86	39,40	1,29	16,17	30,58	121,29
Cystine	0,02	12,19	0,01	19,46	66,26	33,68

Tableau II-3 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et le protocole n°1. Le pourcentage de perte, ainsi que son écart-type, est donné pour le protocole d'hydrolyse. L'écart-type relatif des pourcentages de perte pour la lysine possède des valeurs aberrantes (malgré des écart-types raisonnables sur les ratios aire AA / aire EI), cela est probablement dû au fait que la référence pour cet acide aminé n'est constitué que de deux réplicats (pour un des trois réplicats, la lysine n'a pas été détectée).

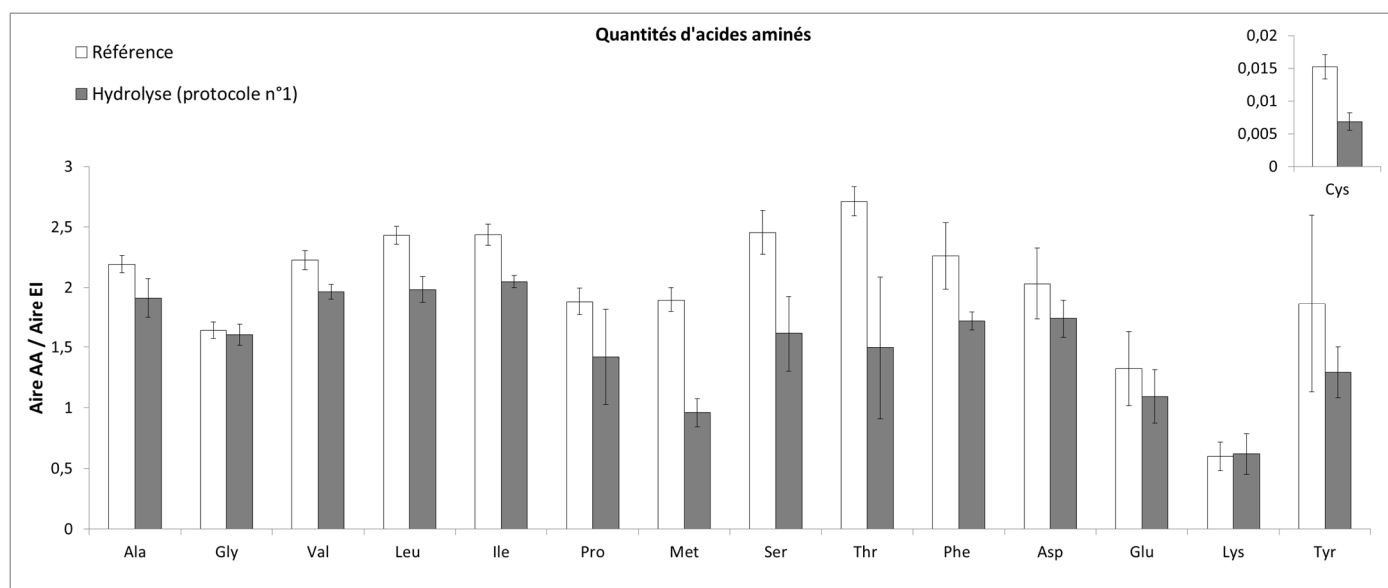


Figure II-16 : Comparaison relative des quantités d'acides aminés (aire du pic de l'acide aminé / aire du pic de l'étalon interne; \pm SD) pour la référence (barres blanches) et pour l'hydrolyse au HCl 6M, 100°C, 24h (protocole n°1) (barres noires) ; pour (A) alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, proline, methionine, serine, threonine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, tyrosine, et (B) cystine.

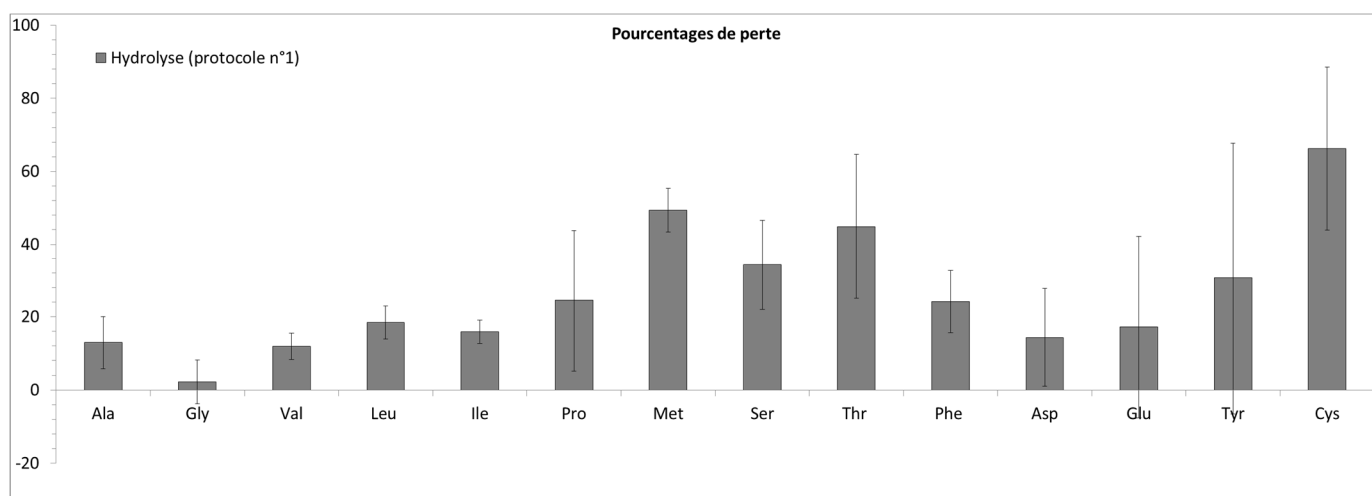


Figure II-17 : Pourcentage relatif de perte (\pm SD) après hydrolyse acide avec chauffage 24h à 100°C (protocole n°1) pour l'alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, proline, methionine, serine, threonine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, tyrosine et cystine.

Tous les autres acides aminés semblent avoir subi des pertes : les quantités de glycine, proline, acide aspartique, acide glutamique et tyrosine sont réduites après hydrolyse. Cependant, les barres d'erreur de la référence et de l'échantillon hydrolysé sont relativement

importantes, à tel point qu'elles se recoupent. Pour ces cinq acides aminés, il faudra donc également considérer l'hypothèse d'une variabilité des résultats entre réplicats qui expliquerait cette différence dans les quantités. Toutefois, il est important de remarquer que malgré cette variabilité, les résultats montrent toujours une diminution des quantités après hydrolyse.

Le pic X est le même que celui de la figure II-11, et on peut observer qu'il est beaucoup plus abondant après hydrolyse. Le fait que ce pic ne soit pas identifiable par la NIST pourrait possiblement provenir du fait qu'il est constitué de multiples espèces co-éluant.

Il pourrait provenir du N-méthyltrifluoroacétamide, un sous-produit neutre et volatil (point d'ébullition de 156-157°C) de la réaction de fonctionnalisation (Knapp, 1979). Cependant, si tel était le cas, il aurait probablement été identifié par la NIST.

Il pourrait également possiblement correspondre à un artéfact résultant de la modification des analytes sous l'influence du réactif de fonctionnalisation. En effet, lorsque la silylation est réalisée dans des conditions acides ou basiques, les analytes sensibles aux milieux acides ou basiques peuvent subir des transformations inattendues. Ce type de transformation peut aussi être causé par le réactif lui-même (Moldoveanu and David, 2002). Cela impliquerait que les conditions de l'hydrolyse acide ont favorisé la formation de cet artéfact. Cependant, il est peu probable que l'ensemble des acides aminés aient été transformé en le même artéfact. De plus, chaque acide aminé aurait dû être transformé en plusieurs artéfacts différents. Pour exemple, Moldoveanu et David (2002) ont montré que la fonctionnalisation du β -D-glucopyranose avec du MTBSTFA (contenant 1% de tertbutyldiméthylchlorosilane, TBDMCS) dans du DMF produisait quatre pics d'aires égales, avec des spectres de masse similaires.

Un type différent d'artéfact peut être généré par une réaction inattendue entre l'analyte et le solvant utilisé pendant la silylation. Moldoveanu et David (2002) donnent un exemple où le DMF réagit avec un groupement amine (figure II-18). Encore une fois, il est peu probable que l'ensemble des acides aminés aient produit le même artéfact (pic X).

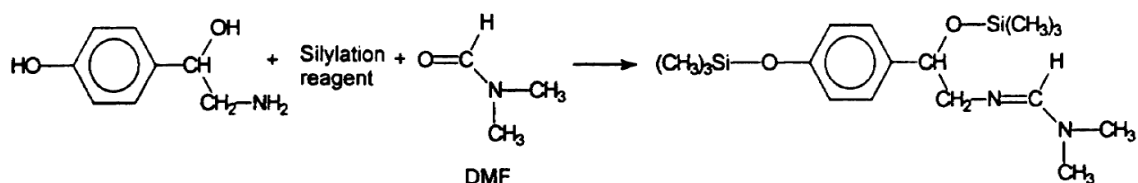


Figure II-18 : production d'un artéfact par réaction entre un analyte, l'agent de silylation, et le solvant (DMF) (source : Moldoveanu and David, 2002)

Le pic A pourrait correspondre quant à lui à l'acide propanoïque (RSI 902, donc une excellente correspondance), et pourrait être le produit de dégradation de n'importe quel acide aminé qui aurait perdu son groupement amine par désamination et sa chaîne latérale.

Parmi les acides aminés pour lesquels la réduction des quantités ne fait aucun doute (c'est-à-dire que les écart-types de la référence et de l'hydrolyse ne se recoupent pas) on trouve, par ordre décroissant : la cystine (66,3%), la méthionine (49,4%), la thréonine (44,8%), la sérine (34,3%), la phénylalanine (24,1%), la leucine (18,4%), l'isoleucine (15,9%), l'alanine (12,9%), et la valine (11,9%).

Dans la littérature, la cystine, la thréonine et la sérine (Hirs *et al.*, 1954; Moore and Stein, 1963) ; et la méthionine (si le tube n'est pas évacué ou sous atmosphère inerte (Tsugita *et al.*, 1987), sont connus pour être les plus facilement dégradés lors de l'hydrolyse.

La cystine a pu être oxydée ou réduite (cassure du pont disulfure pour donner de la cystéine) (Barkholt and Jensen, 1989; Tsugita *et al.*, 1987). Cependant on n'a pas trouvé de cystéine, ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'elle peut être fortement dégradée et non détectable après une hydrolyse acide (Fountoulakis and Lahm, 1998; Roach and Gehrke, 1970)

La dégradation de la méthionine a déjà été relatée dans la littérature. La production de l'un des produits de sa dégradation, la glycine (Osono *et al.*, 1955 dans Roach and Gehrke, 1970), aurait pu expliquer nos faibles pertes en glycine. D'autres produits de sa dégradation incluent l'homocystine et l'homocystéine (Osono *et al.*, 1955, dans Roach and Gehrke, 1970). De plus, la méthionine est connue pour être oxydée si le tube d'hydrolyse n'est pas sous vide / atmosphère inerte (Tsugita *et al.*, 1987 ; Finley, 1985, dans Darragh *et al.*, 1996). L'ajout de 2-mercaptoethanol au HCl avant hydrolyse permet d'éviter son oxydation (Ozols, 1990). Cependant, nous pouvons écarter l'hypothèse de l'oxydation, puisque nous avons travaillé sous atmosphère inerte d'argon.

Les pertes en sérine et la thréonine ne sont pas surprenantes, ces acides aminés étant bien connus pour être facilement dégradés et avoir de faibles taux de recouvrement (*e.g.*, Hirs *et al.*, 1954; Rees, 1946; Roach and Gehrke, 1970; Tsugita *et al.*, 1987), à cause de leur dégradation par déshydratation (Tsugita *et al.*, 1987). Cependant, habituellement, les pertes sont aux alentours de 10 et 5% respectivement (Moore and Stein, 1963; Ozols, 1990), alors que dans notre cas, nous obtenons des pertes de 34,3% et 44,8%, respectivement. Même en prenant en compte les barres d'erreur, c'est plus que mentionné dans la littérature. Nous pouvons en tout cas écarter l'hypothèse d'une pureté non suffisante du HCl (Rees, 1946, Hirs, 1954 ; dans Roach and Gehrke, 1970). En effet, nous avons utilisé pour solution mère du HCl 37% « laboratory reagent grade » (de la marque Fisher Scientific), dilué à 6M avec de l'eau ultrapure.

Les pertes de phénylalanine, leucine, isoleucine, alanine, et valine, sont plus surprenantes, car ces acides aminés ne sont pas connus pour être particulièrement dégradés au cours de l'hydrolyse.

Les acides aminés suivants sont ceux pour lesquels les pertes pourraient potentiellement être expliquées par la variabilité entre expériences ; bien qu'il faille garder à l'esprit que si la variabilité seule expliquait nos résultats, nous n'observerions probablement pas le même comportement de perte pour tous les acides aminés : la tyrosine (30,6%), la proline (24,5%), l'acide glutamique (17,3%), l'acide aspartique (14,3%), et la glycine (2.2%). Il semble donc bien y avoir une baisse des quantités pour tous les acides aminés mentionnés.

Dans la littérature, les acides aspartique et glutamique et la proline sont connus pour être facilement dégradés lors de l'hydrolyse, mais dans une moindre mesure que la cystine, la tyrosine, la sérine, la thréonine et la méthionine (Hirs *et al.*, 1954).

La tyrosine est en effet connue pour être entièrement détruite (Light and Smith, 1963, dans Roach and Gehrke, 1970) bien que certains ont observé qu'elle n'était pas affectée (Lugg, 1938, dans Roach and Gehrke, 1970). Sa destruction peut être limitée grâce à l'utilisation d'une atmosphère inerte lors de l'hydrolyse (Roach and Gehrke, 1970). Il est également possible d'éliminer les traces d'air dissous dans le HCl grâce à une étape de solidification (par diminution de la température), fusion et dégazage (étape rajoutée lors de la mise des tubes sous vacuum, *cf.* Moore and Stein, 1963). Une autre solution est l'ajout de phénol à 0.1% w/v (Sanger and Thompson, 1963, dans Tsugita *et al.*, 1987; Ozols, 1990). Cependant, tout comme

ci-dessus pour la méthionine, nous pouvons écarter cette hypothèse, puisque nous avons travaillé sous atmosphère inerte. De plus, si la tyrosine avait été oxydée, nous aurions trouvé son produit de chlorination oxydative ; c'est-à-dire la 3-chlorotyrosine.

Il semble que la proline puisse présenter une possibilité de dégradation (Roach and Gehrke, 1970).

Pour l'acide aspartique et l'acide glutamique, une décomposition possible a été proposée par Hirs *et al.* (1954). Les auteurs ne donnent pas plus de détails, mais nous pourrions imaginer une décomposition par décarboxylation ou désamination.

Les pertes de glycine sont surprenantes, car cet acide aminé n'est pas connu pour être particulièrement facilement dégradé lors de l'hydrolyse.

Si oxydation il y a, l'oxydation des composés alors qu'on a employé une atmosphère inerte pourrait être causée par une oxydation par H_2O .

Le seul acide aminé pour lequel on n'a pas eu de pertes est la lysine. Il est d'ailleurs considéré comme le plus stable des acides diamminés (Roach and Gehrke, 1970).

Pour résumer, nous pouvons observer une diminution des quantités (par comparaison entre la référence et l'échantillon hydrolysé) de l'ensemble des acides aminés, sauf la lysine. Sur les 14 acides aminés pour lesquels il y a eu des pertes (perte moyenne d'environ 26%, plus ou moins environ 13%), nous pouvons affirmer que pour neuf d'entre eux (l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, et la cystine) ces pertes ne peuvent pas seulement s'expliquer par la variabilité des résultats. On ne peut pas réfuter l'hypothèse que pour les cinq restants (la tyrosine, la proline, l'acide glutamique, l'acide aspartique et la glycine), les pertes pourraient s'expliquer par les importantes barres d'erreur, cependant, si la variabilité seule expliquait réellement nos résultats, nous n'observerions probablement pas ce comportement généralisé de réduction des quantités après hydrolyse.

Ces résultats sont intéressants puisque certains acides aminés ont déjà été détectés dans des météorites grâce à l'hydrolyse au HCl 6M en phase liquide. C'est notamment le cas des acides aspartique et glutamique, de la glycine, l'alanine l'isoleucine, la sérine, la valine,

l'isoleucine et la leucine (Ehrenfreund *et al.*, 2001; Kvenvolden *et al.*, 1970; Monroe and Pizzarello, 2011; Pizzarello and Groy, 2011). Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que quel que soit le protocole d'hydrolyse utilisé, tous les acides aminés analysés ici ont été trouvés dans des météorites, excepté la lysine et la cystine (Burton *et al.*, 2012).

Il est également intéressant de chercher à savoir si cette diminution des quantités d'acides aminés se produit également dans le cas de l'hydrolyse acide au HCl 6M en phase vapeur. Glavin *et al.* (2010) ont soumis un standard d'acides aminés au même protocole d'extraction aqueuse et d'hydrolyse acide en phase vapeur que celle réalisée sur leurs échantillons de météorites, et n'ont observé aucune décomposition ou dégradation thermique des acides aminés.

Nous avons ensuite souhaité savoir si la perte observée était réduite lorsque les acides aminés étaient soumis au même protocole (protocole n°1), cette fois sans l'étape 2 (chauffage à 100°C pendant 24h). Le HCl 6M a été évaporé immédiatement après l'addition à la solution d'acides aminés. Le reste du protocole est identique au protocole n°1. Ainsi, nous pouvons déterminer à quel degré cette perte en acides aminés est causée par l'étape de chauffage à 100°C pendant 24h.

2.3.3) Influence du chauffage pendant la procédure d'hydrolyse (protocole n°2)

Nous avons donc testé l'influence de l'hydrolyse en phase liquide sur le recouvrement des acides aminés, cette fois en évaporant le HCl 6M directement après son ajout à la solution séchée d'acides aminés. Nous avons donc appelé cette procédure un « contact à froid ». Après ajout du HCl au vial contenant les acides aminés sous forme de résidu, le vial est placé à l'évaporation. L'évaporation du millilitre de HCl prend environ deux heures, ce qui correspond au temps de contact entre les acides aminés et le HCl 6M.

A notre connaissance, aucune étude n'a mesuré la perte en acides aminés lors d'un contact avec une solution non chauffée de HCl 6M pendant un court laps de temps.

Le chromatogramme obtenu est qualitativement le même que celui obtenu suite au protocole n°1 (figure II-15) et contient les mêmes pics chromatographiques aux mêmes temps de rétention (figure II-19).

Après mesure des ratios des aires des pics chromatographiques des acides aminés sur l'aire du pic de l'étalon interne, et comparaison de ces résultats (protocole n°2) avec ceux de la référence, nous pouvons observer que seule la lysine n'a subi aucune perte suite à l'hydrolyse (tableau II-4, figure II-20, figure II-21), ce qui était déjà le cas lors du protocole n°1.

Une réduction des quantités – ne pouvant être expliquée par la variabilité des résultats (c'est-à-dire que les écart-types de la référence et de l'hydrolyse ne se recoupent pas) – a été observée pour 9 acides aminés sur les 15 détectés (pourcentages de pertes indiqués entre parenthèses, par ordre décroissant) : l'alanine (22,34%), la glycine (le moins affecté : 11.4%), la valine (19,30%), la leucine (25,14%), l'isoleucine (23,74%), la méthionine (26,60%), la sérine (29,29%), la thréonine (le plus affecté : 33.9%), et la phénylalanine (27,83%) (tableau II-4, figure II-20, figure II-21).

Les acides aminés restants semblent avoir subi des pertes : les quantités de cystine (28,13%), proline (17,07%), tyrosine (16,73%), acide aspartique (15,82%), et acide glutamique (9,21%) sont réduites après hydrolyse. Cependant, les barres d'erreur de la référence et de l'hydrolyse sont trop importantes pour que cette différence ne soit pas explicable par une simple variation des résultats, et ces résultats ne peuvent donc pas nous permettre d'interpréter cette perte comme une conséquence certaine de l'hydrolyse seule.

Comme précédemment les pics X et A sont également présents.

Les interprétations concernant les raisons des pertes en acides aminés et les solutions proposées sont les mêmes qu'au paragraphe 2.3.2.

Pour résumer, lors de cette procédure de contact à froid, quatorze acides aminés sur les quinze ont subi des pertes, avec une perte moyenne d'environ 26%, plus ou moins environ 11%.

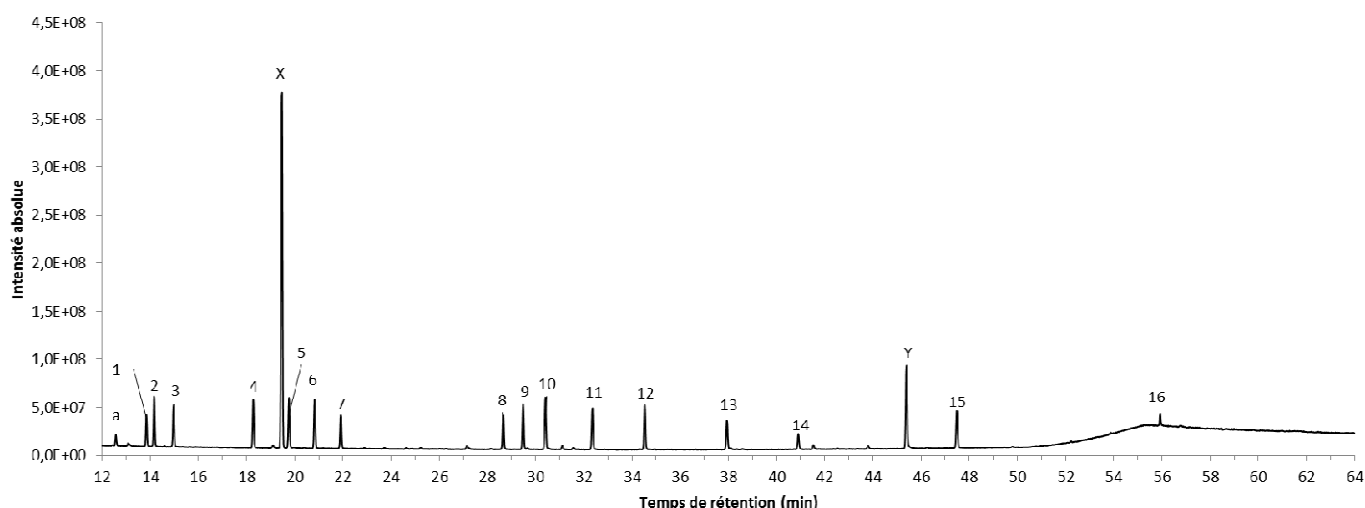


Figure II-19: Analyse chromatographique de la solution soumise au protocole n°2, montrant les acides aminés séparés. Fonctionnalisation avec 10 μ L MTBSTFA, 20 μ L DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μ L du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, détecteur 200°C, colonne 120°C 10 min, rampe 3°C/min jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C/min jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C. Gamme de détection, m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Tyr, 16: L-Cys. A, X, Y : pics non identifiés.

Acide aminé	Référence		HCl 6M, T° ambiante, 0h			
	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Pourc. Perte	ETR (%)
Alanine	2,19	3,20	1,70	3,59	22,34	15,25
Glycine	1,64	4,15	1,45	3,99	11,39	40,13
Valine	2,23	3,54	1,80	3,06	19,30	17,30
Leu cine	2,43	3,14	1,82	2,98	25,14	11,77
Isoleucine	2,44	3,61	1,86	3,94	23,74	15,40
Proline	1,88	6,08	1,56	14,45	17,07	69,69
Methionine	1,90	5,37	1,39	4,56	26,60	18,03
Sérine	2,46	7,33	1,74	5,43	29,29	20,24
Thréonine	2,71	4,40	1,79	13,12	33,89	24,60
Phénylalanine	2,26	12,15	1,63	4,55	27,83	29,44
Acide aspartique	2,03	14,64	1,71	5,01	15,82	74,72
Acide glutamique	1,32	23,20	1,20	8,75	9,21	237,29
Lysine	0,60	19,88	0,59	33,71	1,31	2715,94
Tyrosine	1,86	39,40	1,55	10,15	16,73	255,05
Cystine	0,02	12,19	0,01	26,18	28,13	67,94

Tableau II-4 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et le protocole n°2. Le pourcentage de perte, ainsi que son

écart-type est donné pour le protocole d'hydrolyse. La cause de la valeur aberrante de l'écart-type relatif des pourcentages de pertes pour la lysine est la même que celle avancée au tableau II-3 (deux réplicats seulement pour la référence).

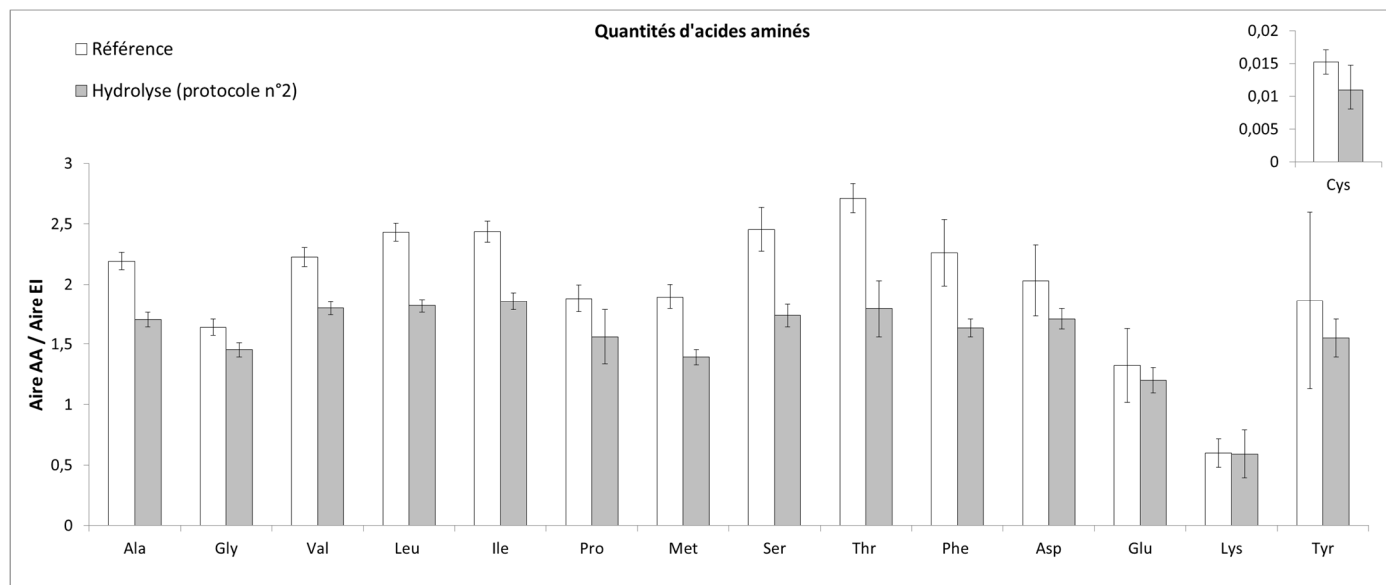


Figure II-20 : Comparaison des quantités d'acides aminés (aire du pic de l'acide aminé / aire du pic de l'étalon interne; \pm SD) pour la référence (barres blanches) et après contact avec une solution de HCl 6M (protocole n°2 (barres grises) ; pour (A) alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, proline, methionine, serine, threonine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, tyrosine, et (B) cystine.

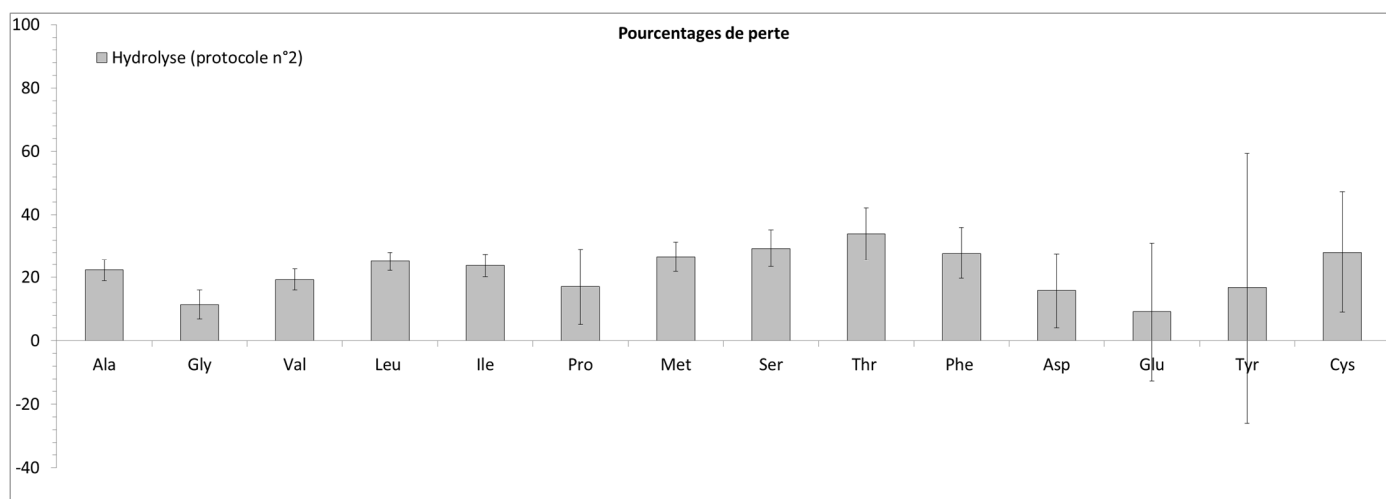


Figure II-21 : Pourcentage de perte (\pm SD) après contact rapide et à froid avec une solution de HCl 6M (protocole n°2) pour l'alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, proline, methionine, serine, threonine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, tyrosine et cystine.

2.3.4) Résumé et comparaison des protocoles n°1 et 2

Les acides aminés qui étaient déjà affectés par l'hydrolyse traditionnelle (barres d'erreur de la référence et de l'hydrolyse ne se recoupant pas) l'ont aussi été par l'hydrolyse à froid, sauf pour la cystine (tableau II-5, figure II-22). Cela pourrait être dû au fait que l'énergie requise pour casser le pont disulfure n'était pas suffisante (énergie de dissociation de liaison de 60 kcal.mol⁻¹; Li *et al.*, 2011).

De manière surprenante, la glycine, qui n'était pas affectée par l'hydrolyse traditionnelle (protocole n°1), l'a été par l'hydrolyse à froid (tableau II-5, figure II-22). Les pertes en glycine sont plus importantes de 9,2% suite à l'hydrolyse à froid (protocole n°2).

L'hydrolyse à froid a également causé des pertes plus importantes pour la valine (7.4% de plus), l'isoleucine (7.9% de plus) et la leucine (6,7% de plus).

Ces résultats surprenants pourraient s'expliquer par les pertes plus importantes de méthionine observées suite au protocole n°1. En effet, l'hydrolyse à froid a causé moins de pertes pour la méthionine (22.8% de moins). Il est possible que lors du protocole n°1, la méthionine soit dégradée en glycine (Osono *et al.*, 1955, dans Roach and Gehrke, 1970), et nous pouvons proposer l'hypothèse que cette dernière puisse également être dégradée en valine, isoleucine et leucine. De plus, d'autres acides aminés que la méthionine pourraient également être dégradés pour former de la glycine, valine, isoleucine et leucine. Ainsi, il est possible que l'observation surprenante de pertes moins importantes pour ces acides aminés, lors de l'hydrolyse à froid, soit explicable par la dégradation de certains acides aminés à forte masse moléculaire (par exemple la méthionine, la cystine, la tyrosine, l'acide glutamique, la proline) en ces acides aminés à plus faible masse moléculaire. Leurs quantités finales mesurées auraient été augmentées, dissimulant des pertes aussi importantes que lors de l'hydrolyse à froid.

Finalement, dans le cas des acides aminés ayant subi plus de pertes lors du protocole n°2 que du protocole n°1 (barres d'erreur des deux protocoles ne se recoupant pas), la différence entre la valeur minimale que peut prendre la moyenne de la quantité (limite inférieure de la barre d'erreur) de l'acide aminé ayant subi moins de perte, n'est que très peu éloignée de la valeur maximale que peut prendre la moyenne de la quantité (limite supérieure de la barre d'erreur) de l'acide aminé ayant subi plus de pertes (figure II-22). Par ailleurs, les écart-types de pourcentages de pertes (calculés de manière à prendre en compte la variabilité

des valeurs sur la référence et les hydrolyses) montrent que pour les acides aminés ayant subi plus de pertes lors du protocole n°2, seule l'isoleucine possède des écart-types qui ne se recoupent pas (figure II-23). Ces résultats sont donc à considérer avec prudence.

Idéalement, il aurait fallu réaliser un test de Student afin de déterminer si les moyennes sont vraiment significativement différentes entre les deux protocoles d'hydrolyse.

Pour tous les autres acides aminés, l'importance des barres d'erreurs ne permet pas de conclure quant à une différence significative dans la quantité de pertes entre les deux hydrolyses (tableau II-5, figure II-22).

Pour la sérine et la thréonine, les barres d'erreur sont plus importantes dans le cas de l'hydrolyse traditionnelle que dans le cas de l'hydrolyse à froid. Cela pourrait indiquer que le chauffage pendant 24h réduit la réplicabilité de la procédure d'hydrolyse pour ces deux acides aminés facilement dégradés lors de l'hydrolyse (tableau II-5, figure II-22).

Excepté pour la cystine et la méthionine, qui ont subi des pertes plus importantes lors de l'hydrolyse traditionnelle (discutable pour la cystine, puisque les barres d'erreurs des protocoles n°1 et n°2 se recouvrent), l'étape de chauffage ne semble pas avoir eu d'influence sur le degré de perte des acides aminés, et les pertes semblent avoir lieu dès que le HCl est mis au contact des acides aminés. La cystine et la méthionine sont les deux acides aminés qui ont montré le plus de pertes au cours de l'hydrolyse traditionnelle, il n'est donc pas surprenant qu'ils se soient montrés les plus sensibles à l'étape de chauffage (c'est-à-dire ayant le plus de réduction de pertes lors du protocole n°2). L'étape de chauffage est probablement essentielle à l'analyse des acides aminés provenant de la matrice météoritique, comme c'est le cas pour l'extraction des acides aminés à partir des protéines – extraction étant à l'origine de celle qui nous intéresse (par exemple, Roache & Gehrke, 1970) – il est donc intéressant de remarquer que cela n'affecte que deux acides aminés à une plus grande échelle.

Pour résumer, l'hydrolyse à chaud (protocole n°1) a entraîné une perte moyenne d'environ 26% (plus ou moins environ 13%), alors que le contact à froid (protocole n°2) a entraîné une perte moyenne d'environ 22% (plus ou moins environ 11%), soit une différence d'environ 4%. Cette différence pourrait s'expliquer par une hydrolyse partielle plus

importante des acides aminés lors de l'hydrolyse à 100°C pendant 24h, par comparaison avec le protocole n°2.

Acide aminé	Référence		HCl 6M, 100°C, 24h				HCl 6M, T° ambiante, 0h			
	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Pourc. Perte	ETR (%)	Aire AA / Aire EI	ETR (%)	Pourc. Perte	ETR (%)
Alanine	2,19	3,20	1,91	8,53	12,93	55,15	1,70	3,59	22,34	15,25
Glycine	1,64	4,15	1,60	5,46	2,23	266,30	1,45	3,99	11,39	40,13
Valine	2,23	3,54	1,96	3,08	11,89	30,46	1,80	3,06	19,30	17,30
Leu cine	2,43	3,14	1,98	5,36	18,40	24,61	1,82	2,98	25,14	11,77
Isoleucine	2,44	3,61	2,05	2,40	15,88	20,24	1,86	3,94	23,74	15,40
Proline	1,88	6,08	1,42	27,63	24,50	78,82	1,56	14,45	17,07	69,69
Methionine	1,90	5,37	0,96	11,93	49,39	12,04	1,39	4,56	26,60	18,03
Sérine	2,46	7,33	1,61	19,41	34,29	35,80	1,74	5,43	29,29	20,24
Thréonine	2,71	4,40	1,50	39,36	44,81	44,16	1,79	13,12	33,89	24,60
Phénylalanine	2,26	12,15	1,72	4,24	24,14	35,01	1,63	4,55	27,83	29,44
Acide aspartique	2,03	14,64	1,74	9,03	14,34	93,05	1,71	5,01	15,82	74,72
Acide glutamique	1,32	23,20	1,09	20,28	17,29	143,87	1,20	8,75	9,21	237,29
Lysine	0,60	19,88	0,62	26,87	-3,33	-927,51	0,59	33,71	1,31	2715,94
Tyrosine	1,86	39,40	1,29	16,17	30,58	121,29	1,55	10,15	16,73	255,05
Cystine	0,02	12,19	0,01	19,46	66,26	33,68	0,01	26,18	28,13	67,94

Tableau II-5 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), permettant la comparaison de la référence, du protocole n°1 et du protocole n°2. Les pourcentages de pertes, ainsi que leurs écart-types, sont donnés pour les protocoles d'hydrolyse.

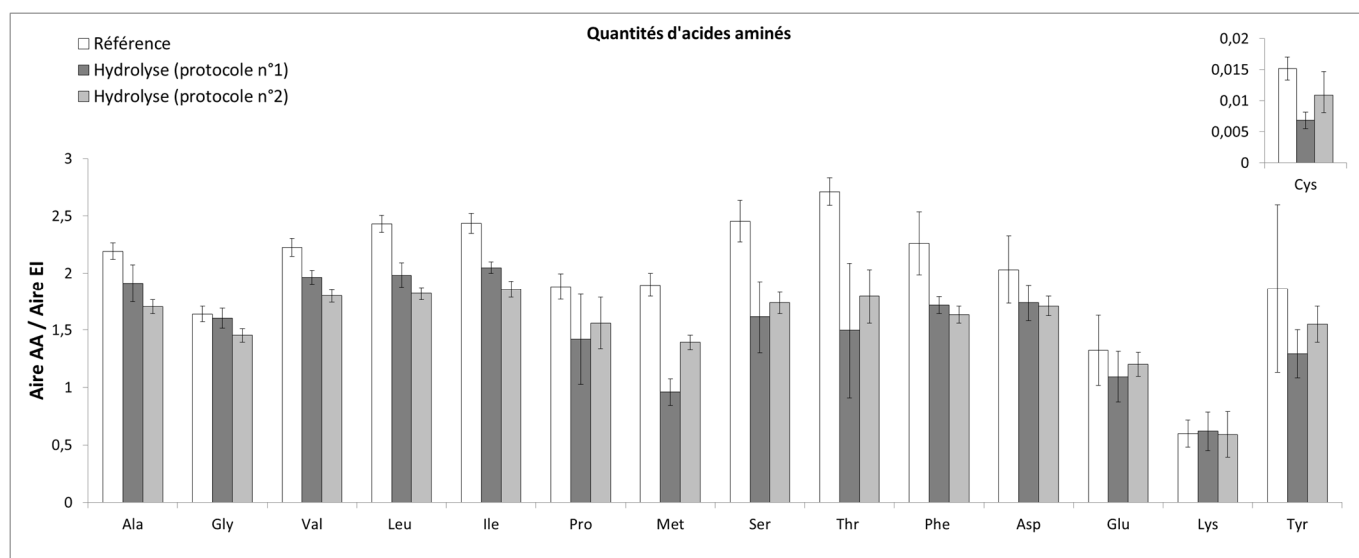


Figure II-22. Comparaison des quantités d'acides aminés (aire du pic de l'acide aminé / aire du pic de l'étalon interne; \pm SD) pour la référence (barres blanches), le protocole n°2 (barres gris foncé) et le protocole n°3 (barres gris clair) ; pour (A) alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, proline, methionine, serine, threonine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, tyrosine, et (B) cystine.

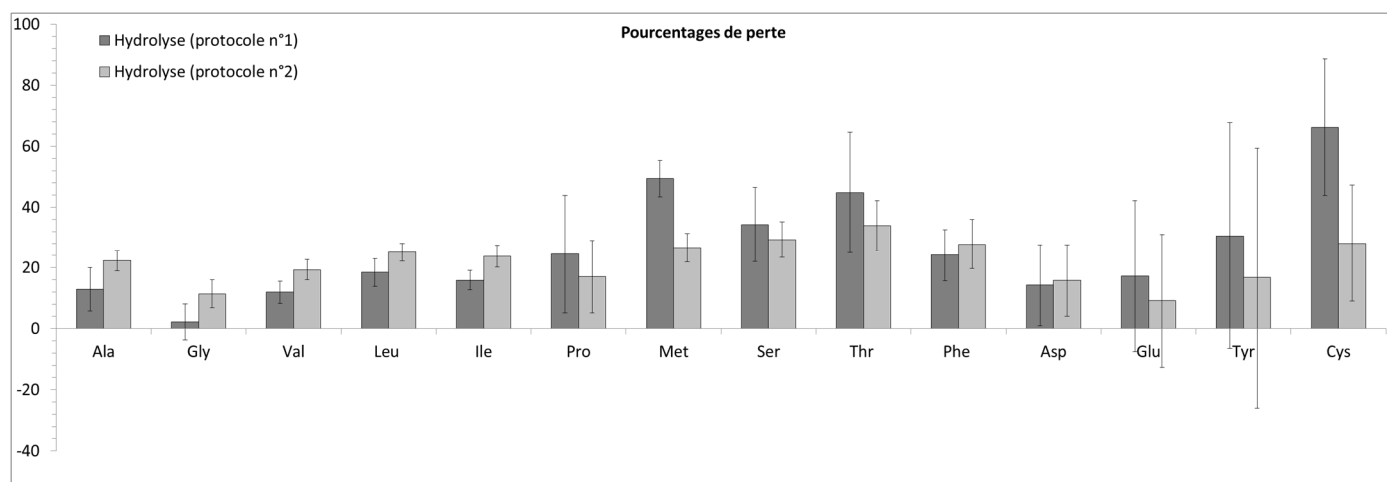


Figure II-23. Pourcentage de perte après hydrolyse au HCL 6M, 100°C, 24h (protocole n°1) et contact à froid avec la solution de HCl 6M (barres gris foncé et gris clair, respectivement) pour l'alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, proline, methionine, serine, threonine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid et tyrosine.

Acide aminé	HCl 6M, 100°C, 24h (protocole n°1)			HCl 6M, T° ambiante, 0h (protocole n°2)		
	% perte	% recouvrement	ET	% perte	% recouvrement	ET
Alanine	12,93	87,07	7,13	22,34	77,66	3,41
Glycine	2,23	97,77	5,93	11,39	88,61	4,57
Valine	11,89	88,11	3,62	19,30	80,70	3,34
Leu cine	18,40	81,60	4,53	25,14	74,86	2,96
Isoleucine	15,88	84,12	3,21	23,74	76,26	3,66
Proline	24,50	75,50	19,31	17,07	82,93	11,90
Methionine	49,39	50,61	5,95	26,60	73,40	4,80
Sérine	34,29	65,71	12,27	29,29	70,71	5,93
Thrénine	44,81	55,19	19,79	33,89	66,11	8,34
Phénylalanine	24,14	75,86	8,45	27,83	72,17	8,19
Acide aspartique	14,34	85,66	13,34	15,82	84,18	11,82
Acide glutamique	17,29	82,71	24,87	9,21	90,79	21,86
Lysine	-3,33	103,33	30,85	1,31	98,69	35,59
Tyrosine	30,58	69,42	37,10	16,73	83,27	42,67
Cystine	66,26	33,74	22,32	28,13	71,87	19,11

Tableau II-6: pourcentages de perte et de recouvrement (100 – pourcentage de perte), et écart-types de ces pourcentages, pour les protocoles n°1 et n°2

2.3.5) Influence des sels générés pendant l'hydrolyse (protocole n°3)

Dans le but d'investiguer si les pertes relevées aux paragraphes précédents pourraient être dues à une destruction des acides aminés au contact avec HCl, ou à une inhibition de la

réaction de fonctionnalisation par la présence de sels, une quantité connue de fluorovaline a été ajoutée aux échantillons, juste avant l'étape de fonctionnalisation. Si les sels sont en cause, alors le rendement de fonctionnalisation de la fluorovaline devrait être affecté de la même manière que les autres acides aminés.

Les ratios des aires de la fluorovaline sur l'aire de l'étalon interne ont été comparés aux mêmes ratios obtenus pour une référence (fluorovaline diluée un volume de 1 mL de HCl 0,1M, puis évaporée et fonctionnalisée).

En utilisant trois réplicats pour la référence (ratio « aire de la fluorovaline / aire de l'étalon interne » moyen de $1,31 \pm 0,02$; soit un écart-type relatif de 1,2%) et quatre réplicats pour l'expérience (ratio « aire de la fluorovaline / aire de l'étalon interne » moyen de $1,34 \pm 0,12$; soit un écart-type relatif de 8,8%), nous avons obtenu un recouvrement de 102,1% ($\pm 9\%$). Ainsi, il semblerait que les sels ne réduisent pas le rendement de la fonctionnalisation de la fluorovaline. Ce résultat pourrait être étendu à tous les autres acides aminés, ce qui indiquerait que c'est la dégradation des acides aminés lors d'un contact (même à froid) avec le HCl 6M qui entraîne des pertes en acides aminés. Il est intéressant de remarquer qu'encore une fois, la présence de sels semble augmenter la variabilité entre les réplicats.

Cependant, l'écart-type du recouvrement de la fluorovaline n'est pas négligeable : il pourrait impliquer un recouvrement minimal de la fluorovaline de 93,1%, soit une perte maximale de 6,9% causée par les sels uniquement, ce qui n'est pas si éloigné de certains pourcentages de pertes obtenus sur les autres acides aminés (par exemple, 2,23% pour la glycine, 9,2% pour l'acide glutamique, ou encore 1,31% pour la lysine).

Ainsi, bien que nos résultats indiquent que le recouvrement de la fluorovaline n'est pas affecté par les sels présents dans le vial, le nombre de réplicats est trop faible au vu de la variabilité des résultats pour pouvoir conclure de manière sûre. Il serait nécessaire de produire de nouveaux réplicats afin de pouvoir conclure.

Il est également possible que la fluorovaline ne réponde de la même manière que les autres acides aminés, possiblement à cause de la présence d'un atome de fluor dans sa structure.

Idéalement, une purification des échantillons avant fonctionnalisation devrait être réalisée afin d'être sûr que les sels ne causent pas le manque de recouvrement des acides aminés.

2.3.6) Comparaison de nos résultats avec les études précédentes

Acides aminés	Durée de l'hydrolyse									
	20-24h								0h	
	1	2	3	4	5	6	Résumé	8	7	9
Alanine*		>98	101,8		87±20 ^a		87 - 101,8	87,1±7,1		77,7±3,4
Glycine*		>98	99,7		112±33 ^b		99,7 - >98	97,8±5,9		88,6±4,6
Valine*		>98	100,9		84±14		84 - 100,9	88,1±3,6		80,7±3,3
Leucine*			98,8		92±9		92 - 98,8	81,6±4,5		74,9±3,0
Isoleucine*		>98	102,9		91±8		91 - 102,9	84,1±3,2		76,3±3,7
Proline*		>98	94,6				94,6 - >98	75,5±19,3		82,9±11,9
Methionine			90,6		88±9		88 - 90,6	50,6±5,9		73,4±4,8
Sérine*	89,5	91,1	90,5	≈90	118±21	83,7	83,7 - 118	65,7±12,3	98,6	70,7±5,9
Thréonine*	94,7		93,2	≈95		92,4	92,4 - ≈95	55,2±19,8	98,7	66,1±8,3
Phénylalanine*			97,7		87±11		87 - 97,7	75,9±8,5		72,2±8,2
Acide aspartique*			98,9		88±9 ^c		98,9	85,7±13,3		84,2±11,8
Acide glutamique*			100,7		124±28 ^d		100,7	82,7±24,9		90,8±21,9
Lysine			97,4				97,4	103,3±30,9		98,7±35,6
Tyrosine*			100	≈95		89,7	89,7 - 100	69,4±37,1	97,3	83,3±42,7
Cystine			97,1	≈95		96,2	≈95 - 97,1	33,7±22,3	104	71,9±19,1

Tableau II-7 : recouvrement (%) des acides aminés lors de de l'hydrolyse au HCl en phase liquide. ^a

Alanine plus tyrosine (co-élution) ; ^b Glycine plus thréonine (co-élution) ; ^c Acide aspartique plus asparagine (désamination) ; ^d Acide glutamique plus glutamine (désamination). 1. Rees, 1946. HCl 6,5N, 110°C, 24h. 2. Corfield et Robson, 1953. HCl 5,5N, ?°C, 24h. 3. Roach et Gehrke, 1970, Table VI. HCl 6M, 145°C, 4h (approximativement équivalent à 110°C, 24h; selon les auteurs). 4. Moore et Stein, 1963. HCl 6M, 110°C, 20h. 5. Keil et Kirchman, 1991. HCl 6M, 110°C, 20h. 6. Hirs *et al.*, 1954. HCl 6M, 110°C, 22h. 7. Hirs *et al.*, 1954. HCl 6M, 110°C, 0h (calculé). 8. Cette étude, HCl 6M, 100°C, 24h (protocole n°1). 9. Cette étude, HCl 6M, T° ambiante, 0h (protocole °2). Les intervalles d'erreurs sont indiqués lorsqu'ils sont donnés dans les articles. * Acides aminés détectés dans des météorites.

Dans le tableau II-7, nous dressons une comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature. Selon les études, pour une hydrolyse en phase liquide pendant 20-24h à 110°C, les acides aminés sont habituellement recouverts avec un taux compris entre 71% pour celui ayant subi le moins de pertes (l'arginine), jusqu'à 118% pour la sérine (ce résultat surprenant indique encore une fois le problème de variabilité rencontré lors de l'hydrolyse d'acides aminés libres). Par exemple, notre étude sur l'hydrolyse en phase liquide avec étape de chauffage a donné un recouvrement de 33.7% pour le plus affecté (la cystine), et jusqu'à 103.3% pour la lysine.

Sur les quinze acides aminés qui ont été quantifiés après l'hydrolyse acide avec étape de chauffage, un recouvrement inhabituel (perte) a été observé pour 11 d'entre eux : la leucine, l'isoleucine, la proline, la méthionine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la tyrosine et la cystine (tableau II-7). Parmi ces acides aminés, certains ont été trouvés dans les météorites, comme l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glycine, l'alanine, l'isoleucine, la sérine, la valine, la leucine (*e.g.*, Burton *et al.*, 2012; Ehrenfreund *et al.*, 2001; Kvenvolden *et al.*, 1970; Monroe and Pizzarello, 2011; Pizzarello and Groy, 2011).

A notre connaissance, c'est la première fois que le recouvrement des acides aminés a été évalué expérimentalement après un contact à froid avec du HCl 6M liquide. Une plus grande perte a été trouvée par rapport aux seuls acides aminés qui avaient été estimés dans la littérature : la sérine, la thréonine et la tyrosine (tableau II-7). Ceci pourrait être encore une fois lié à la grande variabilité des résultats.

2.4) Discussion

Nous pouvons proposer plusieurs interprétations pour expliquer nos résultats. En effet, la réduction des quantités d'acides aminés (recouvrement inférieur à 100%), correspondant à une perte moyenne d'environ 26% (plus ou moins environ 13%) après l'hydrolyse traditionnelle (incluant une étape de chauffage à 100°C pendant 24h) (protocole n°1) peut s'expliquer de plusieurs manières. La plus évidente est que les acides aminés ont pu être dégradés lors de l'hydrolyse acide. Cependant, les résultats obtenus lors d'une hydrolyse à froid (c'est-à-dire sans l'étape de chauffage à 100°C pendant 24h) (protocole n°2) sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors de l'hydrolyse traditionnelle (protocole n°1), voire moindres (d'environ 4%, c'est-à-dire une perte moyenne d'environ 22%, plus ou moins 11%). L'étape de chauffage (100°C, 24h) du protocole n°1 pourrait expliquer la différence de 4% entre les deux protocoles (par dégradation des acides aminés au cours de cette étape), mais il nous faut encore expliquer la perte moyenne de 22% observée lors du protocole n°2 – en d'autres termes, le fait que les pertes soient environ du même ordre de grandeur pour les deux protocoles.

Il nous faut donc considérer la possibilité que les pertes en acides aminés observées lors du protocole n°1 (et par extension lors du protocole n°2) ne sont pas seulement causées par la dégradation des acides aminés au cours de l'étape de chauffage (qui pourrait cependant correspondre aux 4% supplémentaires de perte lors du protocole n°1, par comparaison avec le protocole n°2), mais par un autre facteur, tel qu'une dégradation instantanée entraînée par un contact (même rapide) avec le HCl 6M, ou bien une réduction du rendement de la fonctionnalisation (causée par la présence de sels), ou encore des pertes lors des étapes d'évaporation, ou des pertes liées à la présence de sels d'ammonium (du NH_4Cl est présent dans la solution commerciale d'acides aminés à la même concentration que les acides aminés, $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$).

2.4.1) Hypothèse n°1 : dégradation des acides aminés par hydrolyse

La première hypothèse envisageable pour expliquer les pertes observées lors des protocoles n°1 et 2 est une dégradation des acides aminés par hydrolyse (coupure des liaisons covalentes par l'eau, catalysée par le HCl) (que ce soit lors du protocole n°1, c'est-à-dire un chauffage pendant 24h à 100°C dans une solution de HCl 6M ; ou du protocole n°2, c'est-à-dire un contact rapide à froid avec une solution de HCl 6M). Dans ce cas, les interprétations et solutions données au paragraphe 2.3.2. sont valables. Cependant, les nouvelles molécules formées à partir de la dégradation supposée des acides aminés n'ont pas été identifiées. Cela peut vouloir dire que (i) les acides aminés sont dégradés sans production de nouvelles espèces ; (ii) les acides aminés sont dégradés avec production de nouvelles espèces, mais ces espèces ne sont pas détectées. Ceci pourrait être le cas si les espèces produites sont très polaires et donc non séparables par chromatographie en phase gazeuse (non éluées car trop retenues par la colonne, ou bien restant dans l'injecteur) (cependant, l'étape de fonctionnalisation pourrait en théorie permettre leur détection), ou si elles sont de forte volatilité (faible masse molaire, faible polarité) et donc éluées en début de programmation de température, et par conséquent non détectables du fait de nos conditions d'analyse. En effet, dans notre méthode, le filament du spectromètre de masse n'est allumé qu'à partir de 8 minutes afin de ne pas saturer et oxyder le détecteur avec le MTBSTFA. Finalement, ces nouvelles espèces pourraient être en trop faible quantités pour être détectées.

Une autre explication pourrait être la présence de NH_4Cl dans la solution standard d'acides aminés, qui pourrait avoir une influence sur le taux de décomposition des acides aminés au cours de l'hydrolyse (Fountoulakis and Lahm, 1998). Selon les auteurs, le taux de décomposition des acides aminés au cours de l'hydrolyse acide dépend de la présence de sels. Or NH_4Cl est un sel. Cependant, les auteurs ne vont pas plus loin dans leur explication.

Toutefois, plusieurs indices pointent vers une interprétation alternative de ces résultats.

En effet, les observations ne semblent pas correspondre à celles attendues à partir de la bibliographie : certains acides aminés censés être dégradés ne l'ont pas été (*e.g.* la lysine) et d'autres l'ont été alors qu'ils ne sont pas connus pour être habituellement susceptibles à la dégradation (*e.g.* alanine, valine). À la place, on semble observer une réduction générale des quantités pour tous les acides aminés, de plus grande ampleur que dans toutes les études qui ont été réalisées au préalable.

Il est cependant possible que pour les acides aminés ne semblant pas être dégradés, ils aient été produits à partir de d'autres acides aminés se dégradant.

La glycine, par exemple, un des acides aminés ayant subi le moins de pertes lors de nos analyses (2,2% lors de l'hydrolyse standard, et 11,4% lors de l'hydrolyse à froid) peut être produite lors de la dégradation de la méthionine (Osono *et al.*, 1955, dans Roach and Gehrke, 1970) (Roach et Gehrke ne donnent pas de précision sur le mécanisme de dégradation de la méthionine en glycine, mais nous pouvons imaginer une perte de la chaîne latérale). Or, la méthionine est l'un des acides aminés ayant subi le plus de pertes lors de nos analyses (49,4% lors de l'hydrolyse standard, et 26,6% lors de l'hydrolyse à froid). De plus, la dégradation plus importante de la méthionine lors de l'hydrolyse standard est concomitante (bien que l'on ne puisse pas prouver qu'elle est corrélée, puisqu'elle peut également produire d'autres molécules telles que l'homocystine ou l'homocystéine) avec la perte moins importante de glycine ; et au contraire, la perte moins importante de méthionine lors de l'hydrolyse à froid est concomitante avec la perte plus importante de glycine lors de cette même hydrolyse. Ainsi, il est possible que lors de nos expériences, la méthionine soit dégradée en glycine. Il aurait été intéressant de soumettre la méthionine seule au protocole d'hydrolyse afin de vérifier cette hypothèse.

La lysine peut également produire, lors de sa dégradation, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, de la glycine, et de l'acide alpha-aminoapinique (Ishii, 1954, dans Roach and Gehrke, 1970), mais nous n'avons pas observé de pertes de lysine au cours de nos expériences.

Les acides aminés se dégradant contre toute prédiction (de la littérature) l'ont peut-être été à cause d'un contaminant présent en solution (par exemple le NH_4Cl présent à la concentration de $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ dans la solution standard d'acides aminés, c'est-à-dire à la même concentration que les acides aminés).

De plus, dans le cas du protocole n°1, les barres d'erreur sont bien plus importantes, ce qui pourrait indiquer une influence des sels plus importante lors d'une partie du protocole, ayant pu entraîner une plus grande variabilité des résultats.

Enfin, la constatation allant le plus à l'encontre d'une explication des pertes d'acides aminés au cours des deux protocoles d'hydrolyse par la dégradation des acides aminés, est que les pertes observées sont du même ordre de grandeur dans le protocole n°1 et le protocole n°2, alors que lors du protocole n°1 on réalise un chauffage supplémentaire de la solution de HCl 6M pendant 24 heures à 100°C , contre une évaporation directe de la solution dans le cas du protocole n°2. Cela impliquerait qu'un contact rapide avec une solution de HCl 6M suffirait à entraîner une dégradation des acides aminés du même ordre de grandeur que lors de l'hydrolyse traditionnelle. Or, il a été montré que la dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse acide se faisait graduellement en fonction du temps, lors de l'étape de chauffage à 100°C pendant 24h (cf. figure I-33 au paragraphe 1.5.1.1). Cette constatation semble donc aller contre une explication des pertes observées ici par la dégradation des acides aminés. La dégradation des acides aminés par hydrolyse pourrait néanmoins expliquer les 4% moindres du protocole 2 (dans ce cas causés par l'absence de l'étape de chauffage à 100°C pendant 24h), si différence significative il y a entre les deux protocoles.

Il nous faut donc envisager, pour expliquer les pertes observées lors des deux protocoles, d'autres explications que la dégradation des acides aminés par hydrolyse.

2.4.2) Hypothèse n°2 : autres facteurs

2.4.2.1) Réduction du rendement de la fonctionnalisation causée par la présence d'ions Cl^- lors de la fonctionnalisation

Lors du protocole n°3, nous avons ajouté de la fluorovaline juste avant l'étape de fonctionnalisation, c'est-à-dire après l'étape d'hydrolyse au HCl 6M. Dans le cas où des pertes sont observées pour la fluorovaline, c'est que les sels présents suite à l'évaporation du HCl 6M conduisent à une inhibition de la réaction de fonctionnalisation. Si aucune perte n'est observée, c'est que les pertes des acides aminés sont causées par leur contact avec la solution de HCl 6M.

Nous avons montré grâce à cette expérience que les sels ne semblaient pas avoir d'effet sur la fonctionnalisation de la fluorovaline. Ceci pourrait être étendu à l'ensemble des acides aminés et prouverait que le contact avec le HCl 6M est responsable des pertes observées. Cependant, pour être certain de cette interprétation, il faudrait refaire de nouveaux réplicats, car l'écart-type important peut impliquer une perte de fluorovaline.

L'explication pour laquelle ce sont les sels qui causent la diminution des quantités en acides aminés serait plus cohérente avec les résultats obtenus lors des protocoles n°1 et 2, c'est-à-dire des pertes du même ordre lors de l'hydrolyse sans chauffage et celle à 100°C pendant 24h. En effet, il semble surprenant d'obtenir des pertes du même ordre pour ces deux protocoles différents, la quantité d'énergie apportée étant significativement différente.

Nous allons donc proposer une explication pour la diminution observée des quantités d'acides aminés après les protocoles n°1 et n°2.

Tout d'abord, il semble nécessaire de rappeler certains détails concernant la réaction de fonctionnalisation au MTBSTFA.

a) Mécanisme de la silylation au MTBSTFA

La fonctionnalisation au MTBSTFA est une silylation, et le mécanisme de la silylation est généralement considéré comme étant analogue à une $\text{S}_{\text{N}}2$, comprenant une substitution

nucléophile sur l'atome de silicium (Moldoveanu and David, 2002). La figure II-24 représente la silylation d'un alcool.

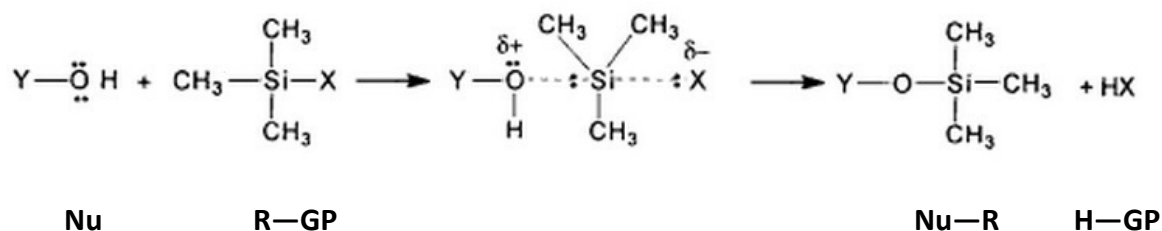


Figure II-24 : mécanisme de la silylation d'un alcool (tiré de Moldoveanu and David, 2002)

Ici, l'alcool (Y-OH) agit en tant que nucléophile (Nu). Un nucléophile est une espèce (ion ou molécule) donneuse d'électron, susceptible de réagir avec un accepteur de type électrophile (charge positive partielle, δ^+) au sein d'une autre espèce. Un nucléophile peut être soit un anion, soit une molécule possédant une charge négative partielle (δ^-) conséquence sur un de ses atomes. Les ions hydroxydes HO^- , ainsi que l'eau et l'ammoniac NH_3 sont des nucléophiles courants. Chacun d'eux possède au moins un doublet non liant d'électrons, soit sur un atome portant une charge négative complète (par exemple l'oxygène de l'ion hydroxyde), soit sur un atome fortement électronégatif portant une charge δ^- conséquence (par exemple l'oxygène de l'eau ou l'azote de l'ammoniac).

Dans le cas d'une substitution nucléophile de type 2 ($\text{S}_{\text{N}}2$), le doublet non liant d'un nucléophile est fortement attiré par la charge δ^+ d'un atome (par exemple, un atome de carbone lié à un halogène au sein d'un halogénoalkane. Cette liaison est de type covalente polaire, avec l'halogène portant la charge δ^- du fait de sa plus grande électronégativité, et le carbone portant la charge δ^+). Une liaison covalente de coordination commence à se former entre ces deux atomes. En conséquence, les électrons de la liaison covalente polaire sont poussés plus avant vers l'atome électronégatif (l'halogène dans le cas d'un halogénoalkane) lié au carbone. Finalement, le nucléophile se lie au carbone (liaison covalente de coordination), et l'atome électronégatif est éjecté. Ce dernier est appelé groupe partant (GP) (X dans le cas de la figure II-24, à ne pas confondre avec le X utilisé pour désigner les halogènes). Le chiffre 2 signifie que l'étape initiale de la réaction met en jeu deux espèces : le nucléophile et R-GP.

Un agent de silylation comporte un groupement x-silyle (triméthylsilyle dans le cas de la figure II-24, *tert*-butyldiméthylsilyle dans le cas du MTBSTFA). Dans le cas du MTBSTFA, l'atome de silicium est lié par liaison covalente polaire à un atome d'azote. Au sein de la molécule R—GP, R est donc le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle, et GP est le groupement N-méthyltrifluoroacétamide. On peut supposer que le Si sera chargé δ^+ , tandis que le N sera chargé δ^- .

Pour la silylation au MTBSTFA, on peut donc supposer le mécanisme suivant : le doublet non liant de l'oxygène est attiré par la charge δ^+ du silicium. Une liaison covalente de coordination commence à se former entre l'oxygène et le silicium. En même temps, les électrons de la liaison covalente polaire Si—N sont poussés encore plus loin vers le N (à ce stade, selon l'étape intermédiaire de la figure II-24, l'oxygène est chargé δ^+). Pour finir, la liaison covalente polaire Si—N est brisée et le groupe partant est éjecté. Dans le cas de la silylation, le groupe partant (X dans la figure II-24, ou plus généralement GP) se lie au H labile provenant du nucléophile. Dans le cas particulier du MTBSTFA, ce groupe partant sera le N-méthyltrifluoroacétamide, et le H labile du nucléophile sera lié à l'atome d'azote. L'espèce nucléophile aura son hydrogène labile remplacé par le groupement R (*tert*-butyldiméthylsilyle dans le cas du MTBSTFA) de R—GP.

Le nucléophile, en donnant son doublet d'électrons, se comporte en base de Lewis. Le groupe partant, en acceptant le doublet d'électrons du silicium, se comporte en acide de Lewis (selon la théorie de Lewis, un acide est un accepteur de doublet d'électrons, et une base est un donneur de doublet d'électrons). De manière similaire aux autres réactions de type S_N2 , le groupe partant est éjecté plus facilement de l'agent de silylation lorsqu'il est plus stable en tant qu'espèce libre. On pourrait s'attendre à ce que cette stabilité soit l'inverse de la basicité du groupe partant, et les meilleurs groupes partants sont les bases les plus faibles. En effet, pour les agents de silylation avec un groupe partant acide, plus HX est acide (*cf.* figure II-24), meilleure est la capacité de l'agent de silylation à donner son groupement silyle (Moldoveanu and David, 2002).

Il est intéressant de noter que l'atome de silicium acceptant le doublet d'électrons du nucléophile est lié à trois groupements alkyle. Ce cas de figure est similaire à une substitution nucléophile sur un halogénoalkane tertiaire, et dans ce cas, la substitution nucléophile est de type 1 (S_N1). En effet, le nucléophile ne peut pas accéder directement à l'atome accepteur d'électrons, à cause de l'encombrement stérique causé par les groupements alkyles.

L'halogénoalkane s'ionise donc dans un premier temps pour former un carbocation, qui réagit ensuite avec le nucléophile. On parle de S_N1 car une seule espèce participe à l'étape initiale. Il serait intéressant de se poser la question de la faisabilité d'une S_N2 sur un atome de silicium lié à trois groupements alkyles, comme c'est le cas pour le MTBSTFA et dans la figure II-24. De plus, la figure de Moldoveanu and David (2002) ne propose pas d'explication relative au mécanisme de l'éjection du H acide du nucléophile. Dans le cas d'une substitution nucléophile sur un halogénoalkane tertiaire, avec H_2O ou NH_3 comme nucléophile, la dernière étape de la S_N1 est l'enlèvement d'un proton de l'espèce produite ($Y-OH_2^+$ et $Y-NH_3^+$; respectivement). Cependant, l'espèce récupérant le proton est H_2O ou NH_3 (respectivement), alors que dans le cas de la silylation, c'est le groupe partant de l'agent de silylation.

b) Mécanisme de la réduction du rendement de la fonctionnalisation par les ions Cl^-

Si on en revient à l'hydrolyse, comment expliquer qu'on obtienne des résultats différents selon si les acides aminés ont été exposés au HCl 6M ou non (c'est-à-dire : hydrolyse et référence ; respectivement)?

L'ion chlorure Cl^- est un bon nucléophile : il est chargé négativement. De plus, la réaction utilise comme solvant le DMF, un solvant polaire et aprotique, c'est-à-dire accepteur de protons, ou encore protophile (remarque : l'IUPAC recommande l'utilisation du terme « protophile », considéré comme plus adapté que le terme « aprotique »). Dans ce type de solvants, la nucléophilicité est corrélée à la basicité (l'inverse d'un solvant polaire protique. Par exemple, Cl^- sera un meilleur nucléophile dans le DMF que dans l'eau, un solvant polaire protique). Finalement, Cl^- n'est pas encombré stériquement, au contraire des groupements cibles de la fonctionnalisation au MTBSTFA, tels que les carboxyles, alcools et amines situés sur les acides aminés ; ce qui fait de lui un meilleur nucléophile que ces derniers. Ainsi, les ions Cl^- pourraient entrer en compétition avec les espèces ciblées lors de la fonctionnalisation, et donc entraîner une diminution du rendement de la fonctionnalisation des acides aminés. Une plus grande quantité de matière de Cl^- dans une modalité que dans l'autre pourrait ainsi entraîner un rendement de fonctionnalisation plus faible, et expliquer les quantités d'acides aminés plus faibles détectées après un contact avec du HCl 6M, que lorsque l'échantillon est analysé directement (référence). Cela impliquerait une quantité de matière plus élevée en Cl^-

lors de la fonctionnalisation dans le cas où les acides aminés ont été en contact avec le HCl 6M, entraînant une quantité d'acides aminés fonctionnalisés plus faible.

Ceci expliquerait d'une part les pertes en acides aminés observées suite à nos deux protocoles d'hydrolyse (protocole n°1 et protocole n°2), et d'autre part le fait que les pertes sont du même ordre de grandeur entre les deux protocoles. En effet, la dilution des acides aminés dans un volume de 1mL de HCl 6M entrainerait une quantité d'ions Cl^- plus importante lors de la réaction de fonctionnalisation, par comparaison avec la référence (la solution utilisée en tant que référence est une solution de HCl 0,1M). Le facteur entraînant les pertes en acides aminés ne serait donc pas le chauffage à 100°C pendant 24h, mais bien la dilution des acides aminés dans la solution de HCl 6M.

Cependant, pour entrer plus dans les détails, comment expliquer une plus grande quantité de Cl^- présents lors de l'étape de fonctionnalisation dans le cas de l'hydrolyse (protocoles n°1 et n°2), alors qu'en fin d'expérience, dans le cas de l'hydrolyse et de la référence, les acides aminés sont dans tous les cas re-dilués dans 1 mL de HCl 0,1M, avant évaporation puis fonctionnalisation?

On supposer la chose suivante : dans le cas où les acides aminés sont dilués dans un volume de 1 mL de HCl 6M, lors de l'évaporation de cette solution, la limite de solubilité des différents sels sera atteinte à un pH plus faible que lorsque les acides aminés sont dilués dans un volume de 1 mL de HCl 0,1M (solution commerciale qui nous sert de référence). Puisque les acides aminés précipitent à un pH plus faible, plus de groupements carboxyles sont protonés lors de leur précipitation. C'est autant de carboxyles qui ne pourront pas précipiter en se liant aux ions NH_4^+ (présents dans la solution commerciale d'acides aminés utilisée pour nos expériences, sous la forme de chlorure d'ammonium NH_4Cl). Au lieu de se lier aux carboxyles, les ions NH_4^+ précipiteront en se liant aux ions Cl^- , reformant du chlorure d'ammonium NH_4Cl . Ainsi, la quantité de matière de Cl^- sera plus élevée dans les sels à la fin de l'évaporation, dans le cas où les acides aminés sont en solution dans du HCl 6M, par comparaison avec du HCl 0,1M. Elle sera donc plus élevée lors de la re-dilution des sels par le DMF.

Dans le cas de l'hydrolyse (protocoles n°1 et n°2 confondus), on aura donc plus de Cl^- dans le résidu sec final, en comparaison avec la référence. Or, comme précisé ci-dessus, Cl^- est un nucléophile, et peut entrer en compétition pour la silylation avec les acides aminés. Plus

de Cl^- pourrait entraîner une quantité plus faible d'acides aminés fonctionnalisés. Le produit de la fonctionnalisation de Cl^- serait la molécule tBDMS-Cl (chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle, ou *tert*-butyldiméthylchlorosilane). Nous ne l'avons pas observée dans nos chromatogrammes, cela pourrait s'expliquer par le fait qu'elle est volatile ($M = 150 \text{ g.mol}^{-1}$) et donc éluée en début d'analyse, avant que le filament du MS ne soit allumé. Le pic X inconnu dans nos chromatogrammes, plus important dans les chromatogrammes des hydrolyses (en comparaison avec la référence), ne semble pas correspondre à cette molécule (il ne possède pas le rapport $m/z = 93$ u, caractéristique du tBDMS-Cl).

Un déséquilibre dans la quantité de Cl^- dans le résidu sec (plus de Cl^- dans le cas d'un résidu sec résultant de l'évaporation d'une solution de HCl 6M, en comparaison avec une solution de HCl 0,1M, à volumes initiaux égaux) pourrait donc entraîner une compétition lors de la silylation et par conséquent pourrait expliquer les quantités plus faibles d'acides aminés détectés dans le cas de l'hydrolyse (protocoles n°1 et n°2 confondus).

Une étude a récemment été réalisée par Belmahdi *et al.* (2014). Afin de déterminer l'influence du pH sur la fonctionnalisation, la silylation des acides aminés au MTBSTFA a été réalisée à plusieurs valeurs de pH (notamment après dilution dans du HCl 11M, HCl 6M et HCl 0,1M). Ces expériences ne comportent pas d'hydrolyse acide. La fonctionnalisation est réalisée avec 30 μL d'un mélange MTBSTFA / DMF (ratio 2 : 1), pendant 15 minutes à 75°C. L'étalon interne consiste en un volume de 4 μL de laurate de méthyle à $8,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ dans du DMF (figure II-25).

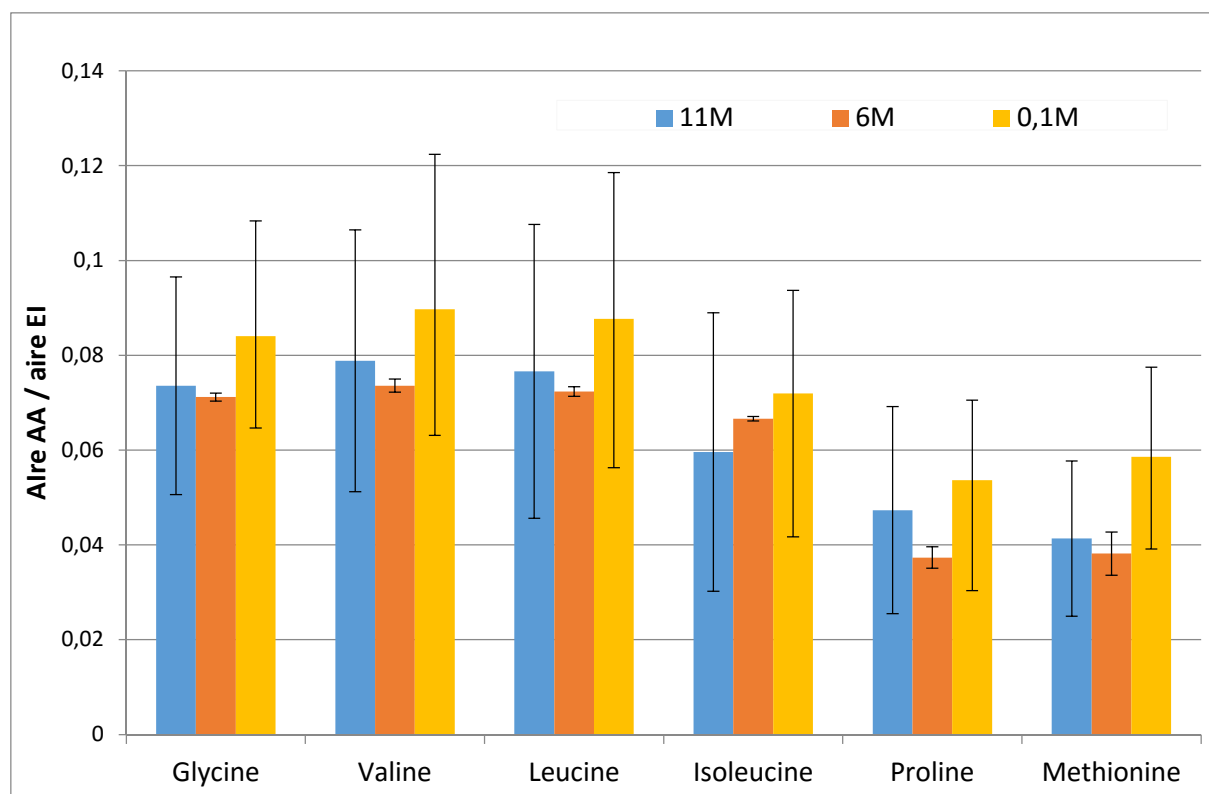


Figure II-25: ratios « aire de l'acide aminé sur aire de l'étalon interne » obtenus pour les expériences avec HCl 11M, 6M et 0,1M

Nous pouvons constater que les quantités en acides aminés semblent plus faibles dans le cas du HCl 11M et 6M que dans le cas du HCl 0,1M. Ceci va dans le sens des résultats présentés dans ce chapitre, et confirmerait l'hypothèse exposée ci-dessus, c'est-à-dire que la dissolution des acides aminés dans une solution fortement concentrée en HCl (11M ou 6M contre 0,1M) entraînerait un rendement de fonctionnalisation moins important (cependant, l'importance des écart-types ne nous permet de conclure sur ce point avec certitude). Ces résultats iraient donc dans le sens d'une explication des quantités réduites d'acides aminés suite à l'hydrolyse acide (traditionnelle ou à froid) à cause des ions Cl^- (cependant, le doute existe à cause de l'importance des écart-types). Néanmoins, cette expérience ne nous permet pas d'écarter l'hypothèse selon laquelle les acides aminés sont dégradés lors de leur contact rapide avec le HCl concentré.

c) Perspectives

Cette explication (le rôle des ions Cl^- dans la réduction des quantités d'acides aminés après fonctionnalisation) démontre et justifie l'intérêt de l'étape de purification (ou « desalting ») par résine échangeuse d'ions (échange de cations) habituellement réalisée dans les travaux recherchant des acides aminés dans les météorites. Un grand nombre de ces travaux utilisent la fonctionnalisation à l'OPA/NAC afin de détecter les acides aminés. (*e.g.* Botta *et al.*, 2007; Glavin *et al.*, 2004, 2010, 2006). Or, la première étape de la fonctionnalisation à l'OPA/NAC est une addition nucléophile. Le N du NH_2 agit comme nucléophile en donnant son doublet non liant. Tout comme dans le cas de la fonctionnalisation au MTBSTFA, des anions présents en solution pourraient donc interagir et réduire le rendement de la réaction. D'où l'intérêt de la purification pré-fonctionnalisation par échange de cations réalisée dans toutes ces publications.

On pourrait se poser la question de la dissociation des sels d'acides aminés (sels hydrochlorides) et du NH_4Cl dans le DMF, ce dernier ne possédant pas une constante diélectrique aussi forte que celle de l'eau, par exemple. Cependant, l'évidence est que l'ensemble des acides aminés est détecté dans une certaine mesure, par conséquent le DMF est capable de dissocier ces sels.

On pourrait également se poser la question de la possibilité de fonctionnaliser des groupements amines protonés, puisque les acides aminés sont sous forme de sels d'hydrochloride avant re-dilution dans le DMF, c'est-à-dire que leurs amines sont protonées. Or, on sait que les cations sont électrophiles, et donc en théorie ne pourraient pas être fonctionnalisés par le MTBSTFA. Cependant, on observe bien les amines fonctionnalisées, et comme l'écrivent Mawhinney *et al.* (1986), « The hydrochloride salts of the amino acids, dissolved in dimethylformamide, are derivatized in a single step with MTBSTFA ». La dissolution dans le DMF permettrait donc la déprotonation des amines, grâce au caractère d'accepteur de proton (protophile) du DMF, qui agirait donc en base de Brønsted (selon la théorie de Brønsted-Lowry, un acide est un donneur de proton, et une base est un accepteur de proton). Ce pourrait être une explication supplémentaire à l'augmentation drastique de l'efficacité de la fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA en présence de DMF (vs. en présence de MTBSTFA seul); en plus du fait, avancé par Mawhinney *et al.*, (1986), que les acides aminés sont très peu solubles dans le MTBSTFA seul.

En guise de perspective, après purification, il serait intéressant de faire varier le pH de la solution qui sert à re-dissoudre les acides aminés avant fonctionnalisation, car en maximisant le nombre de groupements COO^- (vs. COOH) et de NH_2 (vs. NH_3^+), on maximise le nombre de groupements fonctionnalisables, puisque les carboxyles et les amines protonés ne peuvent pas se comporter en tant que nucléophiles (pas de doublets non liants). Cependant, comme expliqué ci-dessus, il semble que même les amines protonées avant ajout de la mixture DMF / MTBSTFA soient silylées par le MTBSTFA.

2.4.2.2) Silylation incomplète des acides aminés ou production d'artéfacts

Comme discuté au paragraphe 2.3.2 (Influence de la procédure d'hydrolyse sur les quantités d'acides aminés), les pertes observées en acides aminés pourraient également s'expliquer par :

(1) une silylation incomplète des acides aminés, avec un pic principal réduit par rapport à la référence (acide aminé complètement silylé), et des pics annexes (acide aminé non-complètement silylé) tombant sous la limite de détection de notre analyse.

(2) la formation d'artéfacts, avec production d'artéfacts multiples pour chaque acide aminé, tombant sous la LOD.

La présence de tBDMS-Cl en plus grande quantité lors de la silylation, dans le cas d'une dilution dans la solution de HCl 6M (protocoles d'hydrolyse 1 et 2) pourrait jouer un rôle dans ceci (effets 1 et 2). En effet, Mawhinney *et al.* (1986) ont observé que les acides aminés basiques (arginine et histidine) étaient complètement absents de leur analyse lorsque le réactif de silylation utilisé était du MTBSTFA contenant 1% de tBDMS-Cl, ce qu'ils interprètent comme une interaction du chlorure de silyle avec la fonctionnalisation de ces deux acides aminés.

Il est possible qu'un excès de tBDMS-Cl (protocoles n°1 et 2) ait pu causer le même effet, cette fois pour l'ensemble des acides aminés ; soit par fonctionnalisation incomplète des acides aminés, soit par production d'artéfacts.

Pour finir, le pic X, observé dans tous les chromatogrammes, non identifié par la NIST, et plus abondant lorsque les acides aminés ont été dilués dans du HCl 6M (vs. la solution nous

servant de référence, qui est du HCl 0,1M), pourrait être causé par la formation d'un seul artéfact (provenant de différents acides aminés), ou de plusieurs artéfacts co-éluant. La présence plus importante d'ions Cl^- à la suite des protocoles n°1 et 2 pourrait expliquer ce résultat, si cette formation d'artéfact(s) est causée par la présence des ions Cl^- , ou de la molécule tBDMS-Cl.

La formation d'artéfacts au cours des réactions de silylation peut habituellement être réduite en n'utilisant pas les réactifs qui sont connus pour générer des artéfacts, ou en évitant des températures inutilement élevées et des durées de réaction inutilement longues (Moldoveanu and David, 2002).

2.4.2.3) Pertes en acides aminés lors de l'étape d'évaporation

Le protocole d'hydrolyse au HCl 6M comportant une étape d'évaporation supplémentaire par rapport au protocole d'analyse de la référence (en plus de l'évaporation de la solution commerciale de HCl 0,1M, il faut évaporer la solution de HCl 6M), une perte hypothétique en acides aminés prenant place au cours de l'évaporation pourrait être un des facteurs expliquant les recouvrements en acides aminés inférieurs à 100% suite au contact avec le HCl 6M (protocoles 1 et 2).

a) Pertes par ébullition / dégradation thermique

Une publication (Neves and Vasconcelos, 1987) mentionne la possibilité de pertes d'acides aminés lors de l'étape d'évaporation, mais ne donne pas de justification. Avec notre évaporation à 40°C sous flux d'argon, il semble difficile de dépasser les températures d'ébullition et de dégradation thermique des acides aminés, et donc d'occasionner des pertes de cette manière.

b) Formation de liaisons peptidiques lors de l'évaporation

On pourrait émettre l'hypothèse que lors de l'évaporation des solutions de HCl, des liaisons peptidiques (liaisons amides) puissent se former entre les acides aminés. La formation d'une liaison amide entre deux acides aminés est une réaction de condensation, avec élimination d'une molécule d'eau (Figure II-26). La formation de telles liaisons semble possible aux valeurs de pH rencontrées lors de l'évaporation.

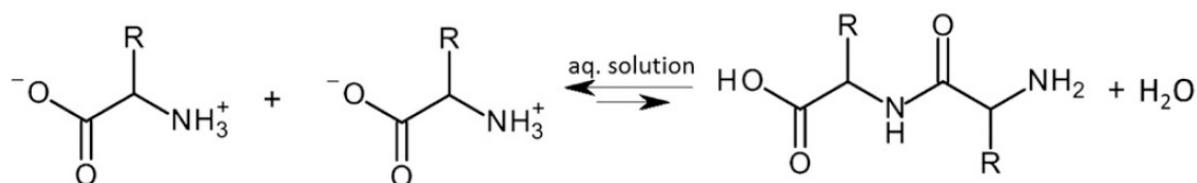


Figure II-26 : formation d'une liaison peptidique (source : Griffith and Vaida, 2012)

Selon Griffith and Vaida (2012), le fait que cette réaction nécessite l'élimination d'une molécule d'eau la soumet à des contraintes à la fois cinétiques et thermodynamiques, lorsqu'elle prend place en solution aqueuse. Ainsi, la constante d'équilibre pour la formation de liaisons peptidiques en milieu aqueux est extrêmement faible, et favorise fortement les monomères d'acides aminés. Cependant, cette constante d'équilibre non-favorable devient favorable lorsque les molécules sont dans un environnement de réaction moins riche en eau. Les auteurs proposent donc l'interface eau-air comme milieu favorable à la formation de liaisons peptidiques (proposant ainsi une hypothèse concernant la synthèse de peptides sur la Terre primitive).

Ainsi, dans notre cas, par formation de telles liaisons, les groupements amines et carboxyles des acides aminés ne seraient plus soumis à la fonctionnalisation au MTBSTFA, entraînant une diminution du rendement de la fonctionnalisation. Le protocole d'hydrolyse au HCl 6M comportant une étape d'évaporation supplémentaire (en plus de l'évaporation de la solution commerciale de HCl 0,1M, il faut évaporer la solution de HCl 6M), la formation plus importante de liaisons peptidiques pourrait expliquer la diminution des quantités d'acides aminés détectés. Si de telles liaisons se forment, il y aurait formation de dimères ou de polymères d'acides aminés, qui ne seraient probablement pas détectés par notre analyse, car trop lourds et trop polaires (élution trop tardive, voire non-volatilisation dans l'injecteur du CPG).

Cependant, dans leur expérience, Griffith et Vaida ont montré la formation de liaisons peptidiques par coordination de l'éthyl ester de leucine avec des ions Cu^{2+} . Or, sauf

contaminations, nos solutions ne contiennent pas de cations métalliques, ce qui empêche la formation de complexes de coordination.

Viedma (2000) a également mis en évidence la formation de liaisons peptidiques lors de l'évaporation d'une solution d'acides aminés.

2.4.2.4) Pertes liées à la présence de sels d'ammonium

Selon Fountoulakis and Lahm (1998), la présence de sels d'ammonium pourrait générer de grandes quantités d'ammoniac NH_3 au cours de l'hydrolyse, ce qui peut affecter l'analyse chromatographique. Or, NH_4Cl , un sel d'ammonium, est présent dans la solution standard d'acides aminés. Cependant, aucun pic correspondant à de l'ammoniac n'a été identifié dans nos chromatogrammes. Aucune interférence liée à la présence de NH_3 n'a donc été relevée. De plus, cette remarque est à considérer avec circonspection, car les auteurs ne précisent pas à quel type d'analyse chromatographique ils font référence.

Pour finir, la présence de NH_4Cl dans la solution commerciale d'acides aminés utilisée au cours de nos expériences pourrait possiblement conduire à une réduction du rendement de fonctionnalisation des acides aminés, par diminution de la solubilité des acides aminés dans le solvant. Cette hypothèse a été proposée pour expliquer la réduction observée de la fonctionnalisation de nucléosides en présence de différents sels (Patel, 1977).

Il est également intéressant de noter que l'absence d'eau lors de la réaction de fonctionnalisation est d'autant plus importante ici, puisque le NH_4Cl est capable de dé-silyler des fonctions hydroxyles silylées dans de l'acétonitrile aqueux (un solvant polaire aprotique, comme le DMF, également utilisé en tant que solvant pour des réactions de silylation, cf. Mawhinney *et al.*, 1986) (Shaabani *et al.*, 2002). Cependant, nous avons pris soin d'éliminer toute trace d'eau avant ajout des réactifs de fonctionnalisation, grâce à une étape d'évaporation de la solution de HCl.

2.5) Conclusion

Nous avons montré ici que l'hydrolyse acide en phase liquide, même sous atmosphère inerte, engendre une perte partielle de la plupart des acides aminés présents dans une solution standard, avec pour certains une perte plus grande que ce qui avait été mesuré auparavant, incluant des acides aminés d'intérêt puisque détectés au sein de certaines météorites. De plus, un contact à froid rapide avec du HCl 6M pour une courte période suffit pour qu'une perte soit observée. Si l'hydrolyse en phase liquide a entraîné une réduction des quantités pour une grande partie des acides aminés présents dans une solution standard, alors elle devrait aussi pouvoir entraîner la même conséquence pour les acides aminés libres présents en solution après l'extraction à l'eau du matériel extraterrestre. De manière similaire, les acides aminés relâchés pendant l'étape d'hydrolyse acide devraient également subir le même sort. Dans la littérature, l'augmentation observée de la quantité totale d'acides aminés après hydrolyse acide, due à la formation d'acides aminés à partir de précurseurs / relâchés à partir d'acides aminés liés, pourrait avoir caché une perte d'acides aminés libres (relâchés pendant l'extraction à l'eau et détruits pendant l'hydrolyse acide) et liés (relâchés et détruits pendant l'hydrolyse acide). Ainsi, dans les analyses sur matériel extraterrestre impliquant l'hydrolyse acide en phase liquide, les quantités d'acides aminés totales auraient pu être sous-estimées.

Cependant, il est tout à fait possible que nos résultats soient explicables par un tout autre facteur, tel que la présence d'une plus grande quantité d'anions Cl^- au cours de l'étape de fonctionnalisation, réduisant les rendements de fonctionnalisation en réagissant avec le MTBSTFA du fait de sa propriété de nucléophile. Cette hypothèse expliquerait également les résultats qualitativement identiques obtenus par contact rapide avec une solution de HCl 6M. Dans ce cas, nous aurions prouvé l'intérêt d'une purification (« desalting ») par échange de cations avant l'étape de silylation pré-colonne dans le cadre de l'analyse des acides aminés météoritiques.

Ces résultats sont d'importance puisque les missions MSL et ExoMars 2018 utilisent et utiliseront la fonctionnalisation au MTBSTFA afin de rechercher des traces de vie passée ou présente sur Mars. La présence d'anions provenant de la matrice minérale pourrait donc se révéler problématique pour la détection d'acides aminés.

2.6) Références

- Allen, D.K., Ratcliffe, R.G., 2009. Quantification of Isotope Label, in: Schwender, J. (Ed.), *Plant Metabolic Networks*. Springer New York, pp. 105–149.
- Barkholt, V., Jensen, A.L., 1989. Amino acid analysis: Determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal. Biochem.* 177, 318–322. doi:10.1016/0003-2697(89)90059-6
- Belmahdi, I., Buch, A., Szopa, C., Brault, A., Freissinet, C., Pinnick, V., El Bekri, J., Coll, P., Teinturier, S., Cabane, M., 2014. Extraterrestrial Material Analysis : Influence of the Acid Hydrolysis on the MTBSTFA Derivatization. Presented at the Eighth International Conference on Mars, p. 1288.
- Botta, O., Bada, J.L., 2002. Extraterrestrial Organic Compounds in Meteorites. *Surv. Geophys.* 23, 411–467. doi:10.1023/A:1020139302770
- Botta, O., Martins, Z., Ehrenfreund, P., 2007. Amino acids in Antarctic CM1 meteorites and their relationship to other carbonaceous chondrites. *Meteorit. Planet. Sci.* 42, 81–92.
- Buch, A., Glavin, D., Sternberg, R., Szopa, C., Rodier, C., Navarro-González, R., Raulin, F., Cabane, M., Mahaffy, P., 2006. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry. *Planet. Space Sci.* 54, 1592–1599.
- Burton, A.S., Stern, J.C., Elsila, J.E., Glavin, D.P., Dworkin, J.P., 2012. Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites. *Chem. Soc. Rev.* 41, 5459–5472. doi:10.1039/C2CS35109A
- Darragh, A.J., Garrick, D.J., Moughan, P.J., Hendriks, W.H., 1996. Correction for Amino Acid Loss during Acid Hydrolysis of a Purified Protein. *Anal. Biochem.* 236, 199–207. doi:10.1006/abio.1996.0157
- Ehrenfreund, P., Glavin, D.P., Botta, O., Cooper, G., Bada, J.L., 2001. Extraterrestrial amino acids in Orgueil and Ivuna: Tracing the parent body of CI type carbonaceous chondrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2138.
- Fountoulakis, M., Lahm, H.W., 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J. Chromatogr. A* 826, 109–134.
- Freissinet, C., Buch, A., Sternberg, R., Szopa, C., Geffroy-Rodier, C., Jelinek, C., Stambouli, M., 2010. Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 731–740. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.009
- Glavin, D., Matrajt, G., Bada, J., 2004. Re-examination of amino acids in Antarctic micrometeorites. *Adv. Space Res.* 33, 106–113.
- Glavin, D.P., Callahan, M.P., Dworkin, J.P., Elsila, J.E., 2010. *NOT OK* The effects of parent body processes on amino acids in carbonaceous chondrites. *Meteorit. Planet. Sci.* 1948–1972. doi:10.1111/j.1945-5100.2010.01132.x
- Glavin, D.P., Dworkin, J.P., Aubrey, A., Botta, O., Doty III, J.H., Martins, Z., Bada, J.L., 2006. Amino acid analyses of Antarctic CM2 meteorites using liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry. *Meteorit. Planet. Sci.* 41, 889–902.
- Griffith, E.C., Vaida, V., 2012. In situ observation of peptide bond formation at the water–air interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 15697–15701. doi:10.1073/pnas.1210029109
- Hirs, C.H.W., Stein, W.H., Moore, S., others, 1954. The amino acid composition of ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 211, 941.

- Knapp, D.R., 1979. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley & Sons.
- Kvenvolden, K., Lawless, J., Pering, K., Peterson, E., Flores, J., Ponnampereuma, C., Kaplan, I., Moore, C., others, 1970. Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* 228, 923.
- Li, X.-Q., Zhang, T., Donnelly, D., 2011. Selective Loss of Cysteine Residues and Disulphide Bonds in a Potato Proteinase Inhibitor II Family. *PLoS ONE* 6, e18615. doi:10.1371/journal.pone.0018615
- Martin, A.J.P., Synge, R.L.M., 1941. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem. J.* 35, 1358–1368.
- Mawhinney, T.P., Robinett, R.S.R., Atalay, A., Madson, M.A., 1986. Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas—liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 358, 231–242. doi:10.1016/S0021-9673(01)90333-4
- Moldoveanu, S.C., David, V., 2002. Sample Preparation in Chromatography. Elsevier.
- Monroe, A.A., Pizzarello, S., 2011. The soluble organic compounds of the Bells meteorite: Not a unique or unusual composition. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 7585–7595. doi:10.1016/j.gca.2011.09.041
- Moore, S., Stein, W.H., 1963. [117] Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods Enzymol.* 6, 819–831.
- Neves, H.J.C.D., Vasconcelos, A.M.P., 1987. Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic—mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic—mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr. A* 392, 249–258. doi:10.1016/S0021-9673(01)94270-0
- Öhlund, J., Näsholm, T., 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiol.* 21, 1319–1326. doi:10.1093/treephys/21.18.1319
- Ozols, J., 1990. [44] Amino acid analysis, in: Murray P. Deutscher (Ed.), *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. Academic Press, pp. 587–601.
- Patel, A.B., 1977. Derivatization and chromatography of nucleosides and nucleotides. *J. Chromatogr.* 130, 115–128.
- Pizzarello, S., Groy, T.L., 2011. Molecular asymmetry in extraterrestrial organic chemistry: An analytical perspective. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 645–656. doi:10.1016/j.gca.2010.10.025
- Rees, M., 1946. The estimation of threonine and serine in proteins. *Biochem. J.* 40, 632.
- Roach, D., Gehrke, C.W., 1970. The hydrolysis of proteins. *J. Chromatogr. A* 52, 393–404.
- Rodier, C., Sternberg, R., Raulin, F., Vidal-Madjar, C., 2001. Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 915, 199–207. doi:10.1016/S0021-9673(01)00625-2
- Shaabani, A., Karimi, A.R., Alamshahi, A.R., 2002. Selective removal of silyl protecting groups from hydroxyl functions with ammonium chloride in aqueous acetonitrile. *INDIAN J. Chem. Sect. B-Org. Chem. Med. Chem.* 41, 1972–1974.
- Sparkman, O.D., Penton, Z., Kitson, F.G., 2011. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Academic Press.
- Stenerson, K.K., 2007. The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GC-MS. *Supelco Report. Newsl. Arch.* 2005-2010 25.3, 17–18.
- Tsugita, A., Uchida, T., Mewes, H., Ataka, T., 1987. A Rapid Vapor-Phase Acid (hydrochloric-Acid and Trifluoroacetic-Acid) Hydrolysis of Peptide and Protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 102, 1593–1597.

Viedma, C., 2000. Formation of Peptide Bonds from Metastable versus Crystalline Phase: Implications for the Origin of Life. *Orig. Life Evol. Biosph.* 30, 549–556.
doi:10.1023/A:1026595809081

Chapitre III : Influence de la minéralogie sur la réaction de fonctionnalisation au MTBSTFA

3.1) Introduction

La fonctionnalisation au MTBSTFA est utilisée dans le cadre de l'exobiologie, à la fois au laboratoire (par exemple pour la fonctionnalisation des molécules organiques extraites de météorites), ou dans des environnements extraterrestres tels que Mars (permettant la détection de molécules organiques dans le régolithe martien). Les molécules organiques ciblées sont des bioindices (par exemple, acides aminés, acides carboxyliques, bases azotées). Dans un premier temps, nous avons choisi comme modèle les acides aminés. Cependant, les expériences réalisées ici seront idéalement appliquées à l'ensemble des bioindices recherchés sur Mars, notamment les acides carboxyliques et les bases azotées.

Mais revenons à la fonctionnalisation : le rendement de cette réaction peut être affecté, notamment par la nature minéralogique de la matrice minérale contenant les molécules organiques cibles. Nous allons donc, dans ce chapitre, essayer de comprendre comment ce rendement est affecté, avant de proposer des solutions qui pourront aider à l'interprétation de données de missions actuelles, et qui pourront être mises en œuvre dans le cadre de futures missions d'exploration.

En effet, en plus de développer des protocoles adaptés à la matrice minérale en présence (comme un échantillon de météorite ou de sol martien), comprendre les mécanismes d'interaction entre le MTBSTFA et les différentes matrices minérales permettra de mieux comprendre la nature de la réduction de rendement de la fonctionnalisation, et ainsi de mieux interpréter les données de missions spatiales actuelles (telles que SAM) et futures (telles que MOMA), dans lesquelles le MTBSTFA est utilisé pour la fonctionnalisation de potentielles molécules organiques présentes dans le régolithe martien. Sans oublier les nombreuses analyses réalisées au laboratoire, dans lesquelles le MTBSTFA est utilisé pour la fonctionnalisation de molécules organiques, présentes au sein de météorites, ou encore d'analogues de sol martien.

Ce chapitre est divisé en trois parties.

Première partie :

Dans un premier temps, il s'agit de lister les potentielles interactions entre le MTBSTFA et les différents types de minéralogies. Des travaux ont en effet montré de possibles baisses de rendement de la fonctionnalisation au MTBSTFA (Buch *et al.*, 2006, Stalport *et al.*, 2012). Afin de lister les minéralogies qui pourraient impacter les rendements de fonctionnalisation, nous avons tout d'abord testé plusieurs types de minéralogies vis-à-vis de la fonctionnalisation. Ainsi, grâce à des expériences sur différents analogues de sol martien, nous pourrions potentiellement infirmer ou confirmer cette hypothèse : des interactions entre le sol et le MTBSTFA peuvent entraîner des baisses du rendement de la fonctionnalisation.

Ces premières expériences vont également nous permettre de répondre en partie à une deuxième question : qu'est-ce qui pose problème ?

Pour rappel (*cf.* paragraphe 1.5.2.1), on suppose que la diminution du rendement de la réaction de fonctionnalisation à cause de la matrice minérale peut s'expliquer de deux manières générales :

(i) Désactivation chimique du MTBSTFA par la matrice minérale :

- Le MTBSTFA peut réagir préférentiellement avec d'autres espèces que les molécules organiques cibles, par exemple avec de l'eau non-structurale, ou possiblement avec des groupements -OH présents dans les minéraux (eau structurale), ou encore des sels (l'interférence chimique des sels, *cf.* Buch *et al.*, 2006). Différents sels ont été détectés sur Mars (sulfates, carbonates, chlorures, perchlorates).

- Le MTBSTFA peut être oxydé lors de la réaction de fonctionnalisation en présence d'agents oxydants, tels que des oxydes de fer ou des perchlorates contenus dans le sol.

(ii) Interaction entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation:

- Au cours de la procédure d'extraction / fonctionnalisation au MTBSTFA en présence de DMF, il peut y avoir un effet destructif sur les molécules organiques présentes dans le sol et sur leurs produits de fonctionnalisation (les molécules organiques fonctionnalisées) :

- Hydrolyse des molécules organiques et / ou des produits de la fonctionnalisation, liée à la présence d'eau (non-structurelle ou structurelle).

- Oxydation des molécules organiques et / ou des produits de la fonctionnalisation, liée à la présence d'agents oxydants (oxydes de fer ou perchlorates).

- Il peut également y avoir une non-disponibilité des molécules organiques pour la fonctionnalisation, par liaison entre le H labile des molécules organiques cibles et l'atome de silicium du sol. Les molécules organiques (fonctionnalisées ou non) peuvent également interagir avec des sels (par exemple par absorption physique des molécules par les sels ; c'est-à-dire une interférence physique des sels, par contraste avec l'interférence chimique des sels, cf. Buch *et al.*, 2006).

Lorsque la fonctionnalisation est réalisée directement sur un sol contenant des molécules organiques cibles, alors tous ces effets (i) et (ii) peuvent prendre place simultanément et fortement affecter le rendement de la fonctionnalisation. Il faut donc dans un premier temps comprendre les possibles interactions entre la matrice (qui peut également être un extrait aqueux de sol ou météorite, contenant par exemple des sels hydrosolubles), les molécules organiques cibles (ainsi que les molécules organiques fonctionnalisées), et les réactifs de fonctionnalisation. Ceci afin de mettre en place un protocole permettant de s'affranchir de ces effets, et surtout d'en tenir compte lors de mesures quantitatives au laboratoire et *in situ*.

Ainsi, afin de pouvoir proposer des solutions à cette diminution de rendement, il faut comprendre ces différentes interactions. Afin de mieux les comprendre, nous pouvons commencer par éliminer un des deux principaux facteurs qui jouent sur le rendement de la fonctionnalisation. Ce facteur que nous proposons d'éliminer, c'est le point (ii), c'est-à-dire l'interaction entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation. Afin d'éliminer cette famille de facteurs, nous proposons l'expérience suivante (inspirée de Buch *et al.*, 2006): chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol, récupération du surnageant, puis fonctionnalisation d'une quantité connue d'acides

aminés. Ainsi, lors de la réaction de fonctionnalisation, la matrice minérale ne peut pas interagir avec molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation.

Résumons les deux hypothèses de travail de cette première partie / expérience:

1) la nature minéralogique de la matrice minérale va entraîner une diminution de rendement de la fonctionnalisation, cette diminution variant selon la nature minéralogique du sol.

2) en éliminant la famille de facteurs (ii) (l'interaction entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation), le rendement de fonctionnalisation est quand même réduit. Ceci permettrait de prouver que la raison de la diminution de rendement provient de la famille de facteurs (i), c'est-à-dire la désactivation chimique du MTBSTFA par la matrice minérale.

Les expériences réalisées dans cette première partie du chapitre III sont la comparaison des performances du MTBSTFA avec ou sans contact préalable avec les différentes matrices étudiées. Plus précisément, nous avons mis le mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol, suivi d'un chauffage (exactement comme si on voulait réaliser une fonctionnalisation), puis nous avons récupéré une partie du mélange MTBSTFA / DMF pour fonctionnaliser une quantité connue de molécules organiques (grâce à une solution standard). La comparaison avec la même quantité d'acides aminés fonctionnalisés par un mélange MTBSTFA / DMF n'ayant subi aucun traitement préalable (la référence) permet de mesurer l'effet direct de la minéralogie sur le mélange MTBSTFA / DMF. Ceci constituera la première partie, intitulée « tests préliminaires ».

Deuxième partie :

Dans le cas où le rendement de la fonctionnalisation est affecté, on va alors chercher à comprendre plus en détail les raisons physico-chimiques de l'impact de la minéralogie de la matrice sur le mélange MTBSTFA / DMF. Pourquoi tel sol pose-t-il problème, au contraire de tel autre ? Dans le cas où un sol entraîne un rendement plus faible qu'un autre, quelle est la différence entre ces deux sols ? Notre hypothèse de départ est qu'une diminution de rendement de la fonctionnalisation est causée par la nature de la matrice minérale. Afin de répondre aux questions soulevées dans cette partie, nous avons caractérisé les analogues

sélectionnés dans le chapitre I, grâce aux techniques d'analyse élémentaire et de thermogravimétrie couplée à la calorimétrie différentielle à balayage et à la spectrométrie de masse (TG-DSC-MS). Les résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre III. Ainsi, nous pourrions être en mesure d'identifier la source du problème, afin de proposer des solutions permettant de le résoudre.

Troisième partie :

Une fois mieux compris les mécanismes de diminution du rendement de fonctionnalisation, nous avons, dans une troisième partie, cherché des solutions adaptées à la nature minéralogique du sol, et ainsi proposé et testé plusieurs protocoles permettant de s'affranchir des effets de la matrice minérale.

3.2) Matériel et produits

Toutes les informations portant sur la stérilisation de la verrerie, la solution standard d'acides aminés, le réactif de fonctionnalisation (MTBSTFA) et le solvant pour la réaction de fonctionnalisation (DMF), la durée et la température de la réaction de fonctionnalisation, et tous les paramètres relatifs à l'analyse par CPG-SM sont décrites dans le chapitre II.

Afin de pallier le problème de la non-détection des acides aminés répondant le moins à la fonctionnalisation (arginine et histidine), la quantité d'acides aminés utilisée a été multipliée par 10 pour l'ensemble de la suite des expériences. Ainsi, 100 µL sont évaporés au lieu de 10 µL. Grâce à cette augmentation de quantité de matière, ces deux acides aminés ont pu être détectés et quantifiés.

3.3) 1^{ère} partie : tests préliminaires

La question posée dans cette partie est la suivante : les acides aminés sont-ils détectés lorsque le mélange MTBSTFA / DMF est précédemment chauffé (75°C pendant 15 minutes, conditions standard de fonctionnalisation utilisées dans cette thèse) en présence de l'analogue, puis utilisé pour fonctionnaliser une quantité connue d'acides aminés ?

Notre première hypothèse est que la nature minéralogique du sol peut avoir un effet sur le rendement de la réaction de fonctionnalisation au MTBSTFA. Une telle réduction de rendement pourrait s'expliquer par des interactions, au cours de la fonctionnalisation de molécules organiques présentes dans le sol, entre la matrice minérale, l'agent de fonctionnalisation, et les molécules organiques cibles et molécules organiques fonctionnalisées.

Notre seconde hypothèse est que la diminution de rendement de la fonctionnalisation provient de la désactivation chimique du MTBSTFA par la matrice minérale (famille de facteurs (i)).

En chauffant le mélange MTBSTFA / DMF en présence de la matrice minérale, avant d'utiliser une fraction de ce mélange pour fonctionnaliser une quantité connue d'acides aminés, nous serons en mesure de confirmer ou d'infirmer ces deux hypothèses. Elles seront testées sur un échantillon de sol d'Atacama (analogue de sol martien reconnu pour sa nature oxydante), un échantillon de sol de Svalbard (constitué majoritairement de smectite), et un échantillon de sol de Rio Tinto (constitué de sulfates hydratés).

3.3.1) Protocoles

Le protocole suivi est le suivant :

La référence : dans un premier temps, une référence est établie : une quantité connue d'acides aminés est fonctionnalisée grâce à un mélange MTBSTFA / DMF. La fonctionnalisation est considérée comme étant proche de 100% (Rodier *et al.*, 2001). Cette référence permettra donc d'évaluer les quantités d'acides aminés perdues lors des différents tests présentés ci-après.

L'expérience sur le sol : Un mélange MTBSTFA / DMF (ratio 3 : 1) est chauffé en présence d'un échantillon d'analogue martien. Ce mélange est récupéré et est utilisé pour fonctionnaliser une quantité connue d'acides aminés.

Dans ces deux expériences, un étalon interne (le laurate de méthyle) est ajouté avant l'étape d'injection en CPG. L'ajout d'un étalon interne en quantité connue permet de s'affranchir de certains biais, comme par exemple celui lié à la réponse du spectromètre de masse (qui n'est pas parfaitement proportionnelle à la quantité du soluté étudié) ; ou encore de faire fi de la variabilité des résultats, causée par la préparation de l'échantillon, l'injection manuelle, ou l'appareillage. La comparaison des ratios « aire du pic de l'acide aminé sur l'aire du pic de l'étalon interne », entre l'échantillon de référence et l'échantillon expérimental, permet de déduire l'efficacité de la réaction de fonctionnalisation. Cette comparaison entre la référence et l'expérience permet de déterminer si le MTBSTFA a été ou non désactivé lors de son chauffage en présence du sol (réaction avec des molécules organiques, des minéraux, des agents oxydants, de l'eau ou des sels).

a) La référence

Un volume de 100 μL de la solution standard d'acides aminés est déposé dans un vial et évaporé sous argon (quantité de matière $n = 2,5 \cdot 10^{-7}$ mol). Après évaporation, 60 μL de MTBSTFA et 20 μL de DMF (ratio 3 :1) (volume total : 80 μL) sont ajoutés au résidu sec. La solution résultante est ensuite agitée grâce à un vortex, puis chauffée à 75°C pendant 15 minutes, afin de permettre la fonctionnalisation des acides aminés. Un volume de 0,5 μL de cette solution est prélevé grâce à une seringue et injecté dans un CPG, couplé à un SM. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : injecteur à 250°C, split mode 1/20, détecteur à 200°C. Le programme de température de la colonne est le suivant : isotherme de 120°C pendant 10 minutes, suivi d'une rampe de 3°C.min⁻¹, jusqu'à 250°C, suivi par une deuxième rampe de 10°C.min⁻¹, jusqu'à 300°C, avec un isotherme de 5 minutes à 300°C. La gamme de détection du spectromètre de masse inclut les rapports m/z de 50 à 650 u.

b) L'analogue de sol martien

En parallèle, 25 mg de sol sont prélevés et déposés dans un vial. Des volumes de 90 μL de MTBSTFA et 30 μL de DMF (ratio 3 :1) y sont ajoutés. L'ensemble est mélangé grâce à un vortex, puis chauffé à 75°C pendant 15 minutes. Une centrifugation est ensuite réalisée (3500 tours par minute pendant 3 minutes) et 80 μL du surnageant est récupéré. Ce surnageant est

ajouté à un vial contenant 100 μL de la solution standard d'acides aminés évaporée ($n = 2,5 \cdot 10^{-7}$ mol). La solution résultante est mélangée grâce à un vortex et fonctionnalisée en chauffant à 75°C pendant 15 minutes. 0,5 μL de cette solution est prélevée grâce à une seringue et injectée dans un CPG, couplé à un SM. Ce protocole a été réalisé avec les trois analogues sélectionnés : Atacama, Svalbard et Rio Tinto.

c) Schéma récapitulatif

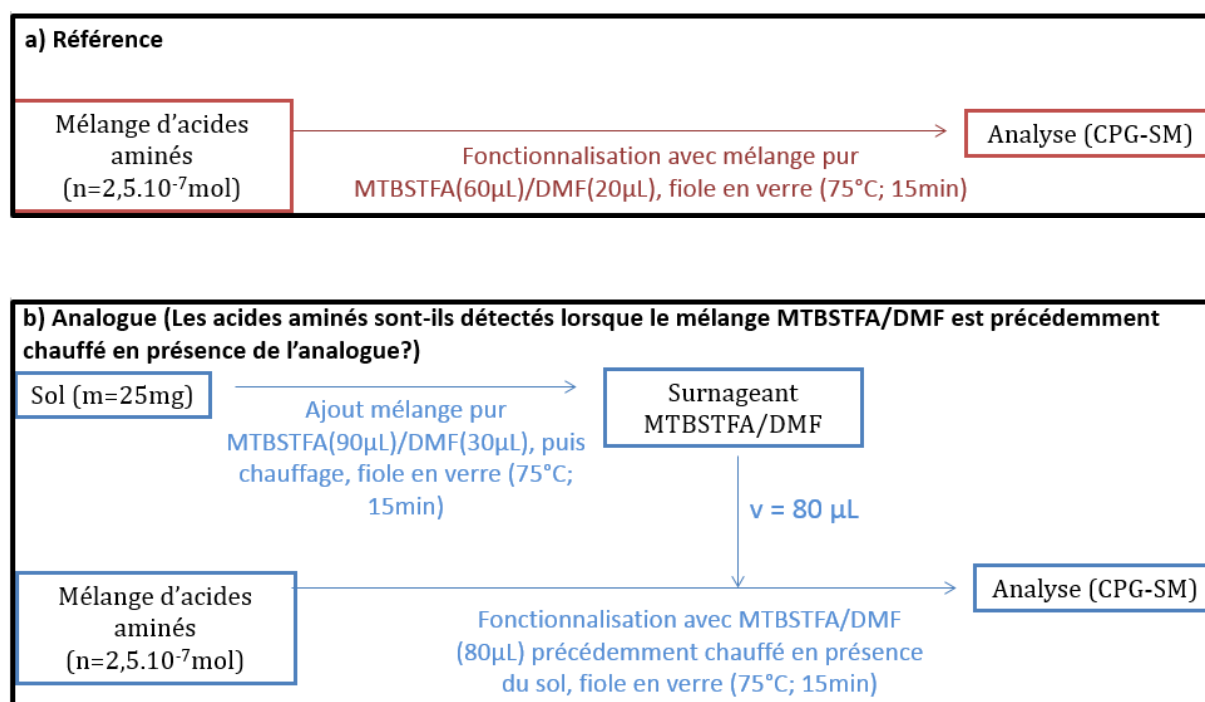


Figure III-1: schéma récapitulatif des expériences réalisées au cours de la partie 3.3).

3.3.2) Résultats et discussion

Nous présentons ici les différents résultats de fonctionnalisation d'un mélange standard d'acides aminés après contact du MTBSTFA avec différents types de matrices minérales : un sol oxydant (le sol d'Atacama), un sol contenant un minéral hydraté (smectite du sol de Svalbard) et un sol contenant des sels, qui sont dans ce cas également des minéraux hydratés (sulfates hydratés de Rio Tinto). Nous qualifierons par la suite ces différentes natures minéralogiques par les expressions suivantes: sol oxydant (Atacama), smectite (Svalbard), et sulfates hydratés (Rio Tinto).

3.2.2.1) Référence

La référence consiste en l'analyse d'une quantité connue d'acides aminés, obtenue grâce à l'évaporation d'un volume connu d'une solution standard commerciale. Le rendement de la fonctionnalisation des acides aminés d'une solution standard commerciale est considéré proche de 100%. Ainsi, cette référence permet, par comparaison avec les tests effectués sur les différents sols, d'évaluer l'efficacité de la réaction de fonctionnalisation pour chaque échantillon de sol. La différence de rendement de fonctionnalisation entre la référence et l'expérience (en pourcentage) est exprimée par le terme « recouvrement ».

Prenons un exemple : après fonctionnalisation d'une quantité connue de solution standard, nous obtenons un ratio « aire de l'acide aminé / aire de l'étalon interne » de 1 pour l'alanine. Cette valeur obtenue est la valeur de référence. Après fonctionnalisation de la même quantité de solution standard, avec cette fois-ci un mélange MTBSTFA / DMF qui a au préalable été chauffé en présence du sol, nous obtenons un ratio « aire de l'acide aminé / aire de l'étalon interne » de 0,5 pour l'alanine. Ceci veut dire que le recouvrement pour l'alanine est de 50%. Le rendement de la réaction de fonctionnalisation a été réduit.

Après analyse de la référence, tous les acides aminés de la solution standard sont séparés et détectés (figure III-2). On peut remarquer que certains acides aminés ont une intensité absolue moindre par rapport à d'autres, ce qui est le cas de l'histidine, et plus particulièrement de l'arginine. Comme discuté dans le chapitre II, ces acides aminés sont les plus difficiles (au sein de notre mélange standard) à détecter, d'une part car leur élution se déroule à haute température (la valeur de la limite de détection est augmentée, à cause de la ligne de base plus intense qu'en début d'analyse, causée par le « bleeding » de la colonne). Ceci est dû à leur haut poids moléculaires après fonctionnalisation, et leur faible volatilité, même après fonctionnalisation.

D'autre part, leur fonctionnalisation pourrait avoir généré plusieurs espèces chimiques différentes, dont certaines non-détectées car leur quantité tombe sous la limite de détection. L'arginine, par exemple, est connue pour produire plus d'un dérivatif (Allen and Ratcliffe, 2009; Mawhinney *et al.*, 1986; Neves and Vasconcelos, 1987; Öhlund and Näsholm, 2001).

Pour finir, les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) sont les plus difficiles à fonctionnaliser, et nécessitent un temps de réaction supplémentaire afin d'atteindre un rendement maximal de fonctionnalisation (Neves and Vasconcelos, 1987). L'arginine semble être l'acide aminé le plus difficile à fonctionnaliser complètement (Neves and Vasconcelos, 1987), c'est-à-dire l'acide aminé dont la fonctionnalisation de tous ses H labiles fonctionnalisables est la plus difficile à obtenir. Le schéma de fragmentation de l'arginine est également difficile à prédire (Allen and Ratcliffe, 2009). L'histidine, quant à elle, possède un groupement bêta-imidazole. Or il a été montré que les composés imidazole silylés sont eux-mêmes d'excellents donneurs de la fonction silyle (Mawhinney *et al.*, 1986). L'histidine est donc probablement facilement sujette à la désilylation de son groupement imidazole silylé, limitant ainsi sa détection par CPG-SM.

Le composé présent à $t_R = 20,8$ minutes n'a pas pu être identifié. Il est présent dans tous les chromatogrammes présentés dans cette thèse. Il s'agit très certainement d'un sous-produit de la fonctionnalisation d'un ou plusieurs acides aminés.

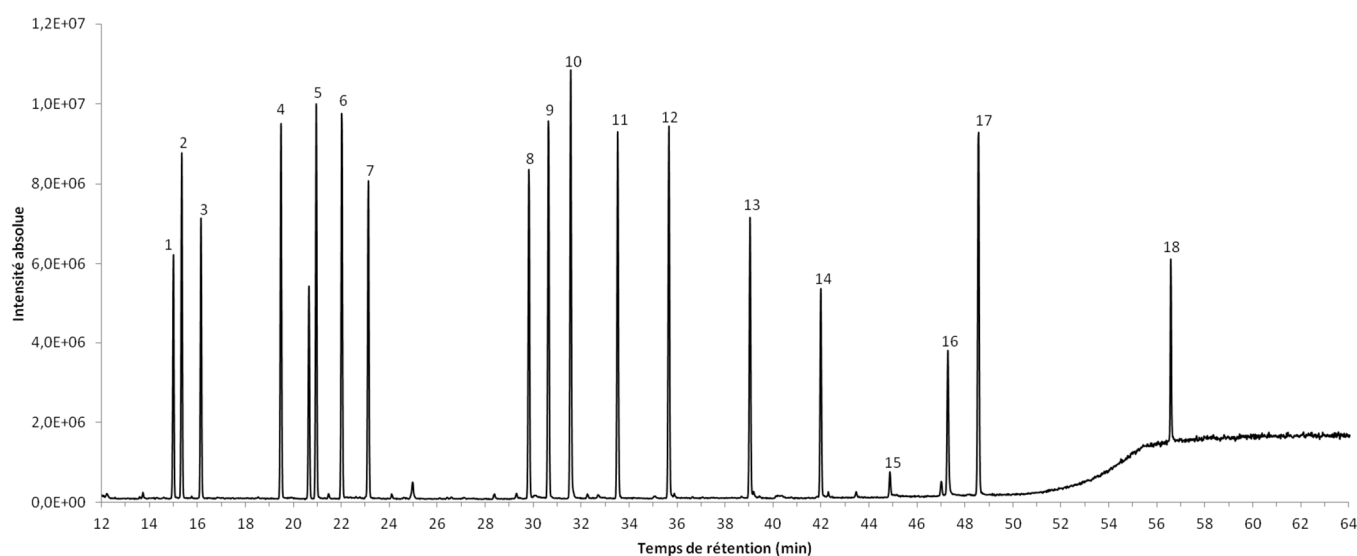


Figure III-2: Chromatogramme des acides aminés séparés (référence). Fonctionnalisation avec 60 μL de MTBSTFA, 20 μL DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μL du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, détecteur 200°C, colonne 120°C 10 min, rampe 3°C.min⁻¹ jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C.min⁻¹ jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C. Gamme de détection, m/z de 50 à 650.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Arg, 16: L-His, 17: L-Tyr, 18: L-Cys.

3.2.2.2) Sol oxydant (Atacama)

Après fonctionnalisation d'une quantité d'acides aminés égale à celle de la référence, grâce au mélange MTBSTFA / DMF précédemment chauffé en présence du sol d'Atacama, on obtient le chromatogramme présenté en figure III-3. D'un point de vue qualitatif, on observe sur ce chromatogramme (figure III-3) l'intégralité des acides aminés étudiés, avec des rapports signal sur bruit (S/N) du même ordre de grandeur que ceux trouvés lors de l'analyse de la référence. De même, les temps de rétention de chaque acide aminé concordent avec ceux obtenus lors de l'analyse de la référence.

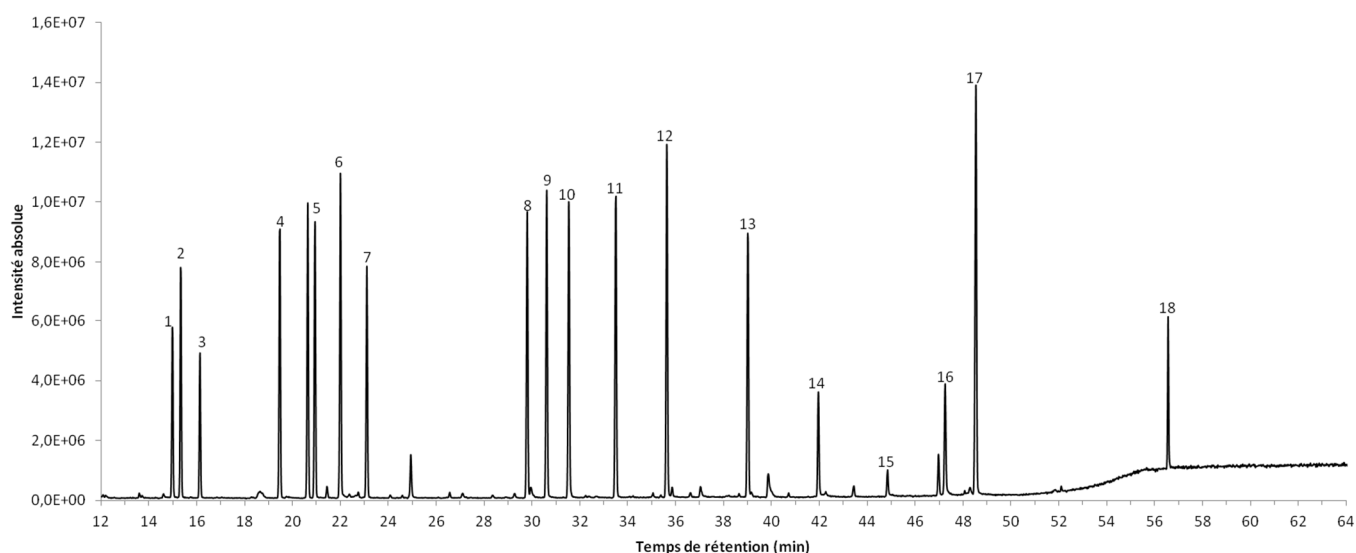


Figure III-3: Chromatogramme des acides aminés séparés, après fonctionnalisation avec un mélange de MTBSTFA / DMF précédemment chauffé en présence d'un échantillon d'Atacama.

Fonctionnalisation avec 60 μ L de MTBSTFA, 20 μ L DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μ L du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, détecteur 200°C, colonne 120°C 10 min, rampe 3°C/min jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C/min jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C.

Gamme de détection, m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Arg, 16: L-His, 17: L-Tyr, 18: L-Cys.

L'analyse semi-quantitative du recouvrement (comparaison entre la référence et l'expérience sur Atacama) des différents acides aminés montre que ce dernier varie de 41,3%

(lysine) à 94,4% (isoleucine), selon les acides aminés (tableau III-1, figure III-4 et figure III-5). Seulement pour l'alanine, la glycine, la proline, la sérine, la lysine, l'histidine et la cystine, on peut affirmer avec certitude que les rendements de fonctionnalisation sont plus faibles que ceux observés après fonctionnalisation de l'échantillon de référence (en effet, pour ces acides aminés seulement, la variabilité entre la référence et l'expérience ne peut pas être expliquée par les barres d'erreur).

Les recouvrements plus faibles de la lysine et de l'histidine (comparativement aux autres acides aminés) peuvent s'expliquer par les raisons citées au paragraphe précédent. Celui de la cystine peut s'expliquer par le fait que cet acide aminé est élué en fin d'analyse (aplatissement du pic, dissimulation par le « bleed » de la colonne). Ainsi, la cystine (mais aussi la lysine et l'histidine), en cas de diminution du rendement de la fonctionnalisation, sont les acides aminés qui voient leurs quantités détectées réduites de manière plus importante. Cependant, ce n'est pas le cas pour l'arginine.

Acide aminé	Référence		Atacama			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	1,63	6,02	1,40	3,30	86,33	2,85
Glycine	1,32	8,91	0,87	8,91	65,76	5,86
Valine	1,87	7,71	1,75	3,87	93,15	3,61
Leucine	2,00	8,97	1,78	5,02	89,05	4,47
Isoleucine	2,11	9,92	1,99	3,37	94,39	3,18
Proline	1,82	10,21	1,43	4,75	78,31	3,72
Méthionine	2,05	14,29	1,85	2,82	90,22	2,54
Sérine	2,44	14,50	1,99	3,44	81,59	2,80
Thréonine	2,57	15,81	2,08	6,68	81,02	5,41
Phénylalanine	2,42	17,20	2,13	4,19	88,39	3,70
Acide aspartique	2,61	19,09	2,32	2,13	89,11	1,90
Acide glutamique	2,08	22,68	1,83	2,16	87,81	1,90
Lysine	1,62	30,02	0,67	5,06	41,31	2,09
Arginine	0,24	76,50	0,21	8,85	86,72	7,68
Histidine	1,35	29,23	0,78	4,60	58,28	2,68
Tyrosine	3,15	23,25	2,71	4,31	86,04	3,71
Cystine	1,14	26,32	0,70	7,05	61,12	4,31

Tableau III-1 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol d'Atacama. Le pourcentage de recouvrement, ainsi que son écart-type, est donné pour l'expérience sur le sol d'Atacama.

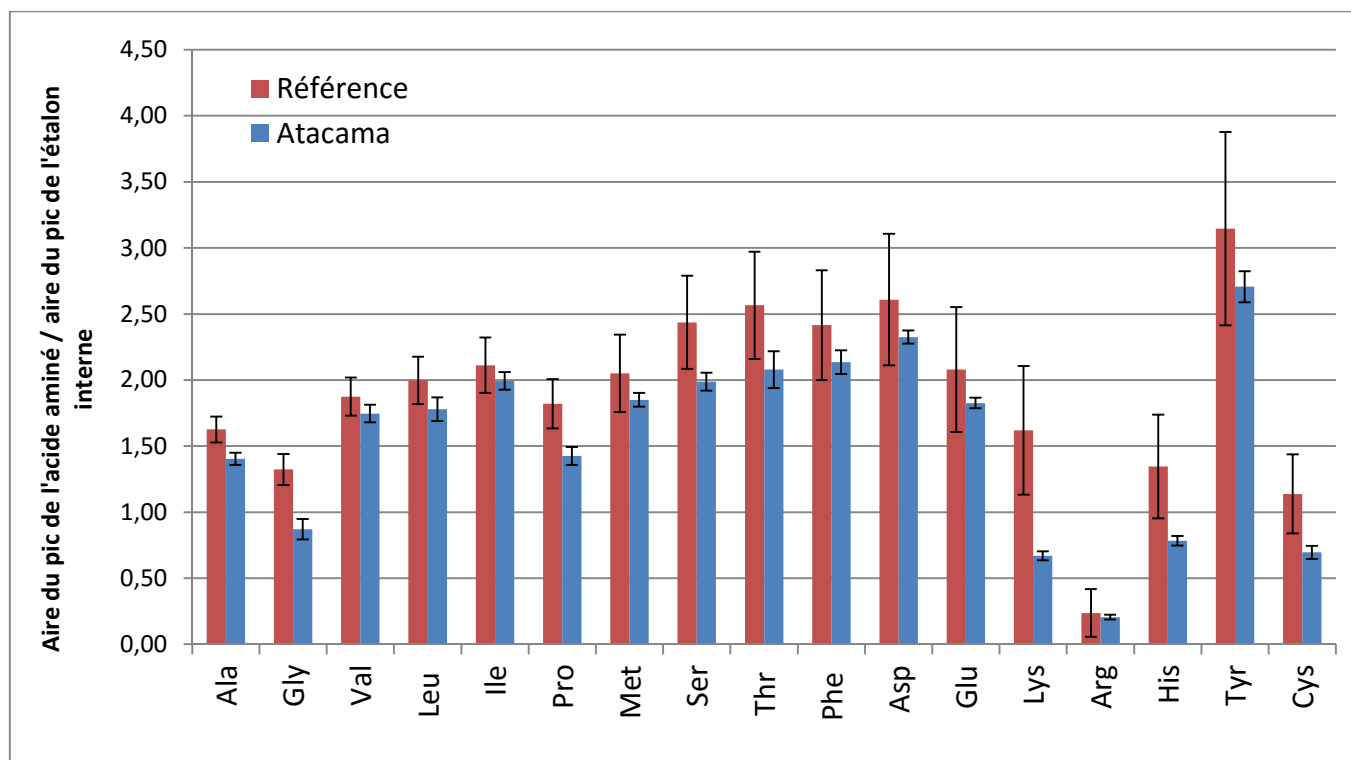


Figure III-4: Quantités d'acides aminés avec ou sans chauffage préalable de la solution de MTBSTFA / DMF au contact de l'échantillon d'Atacama

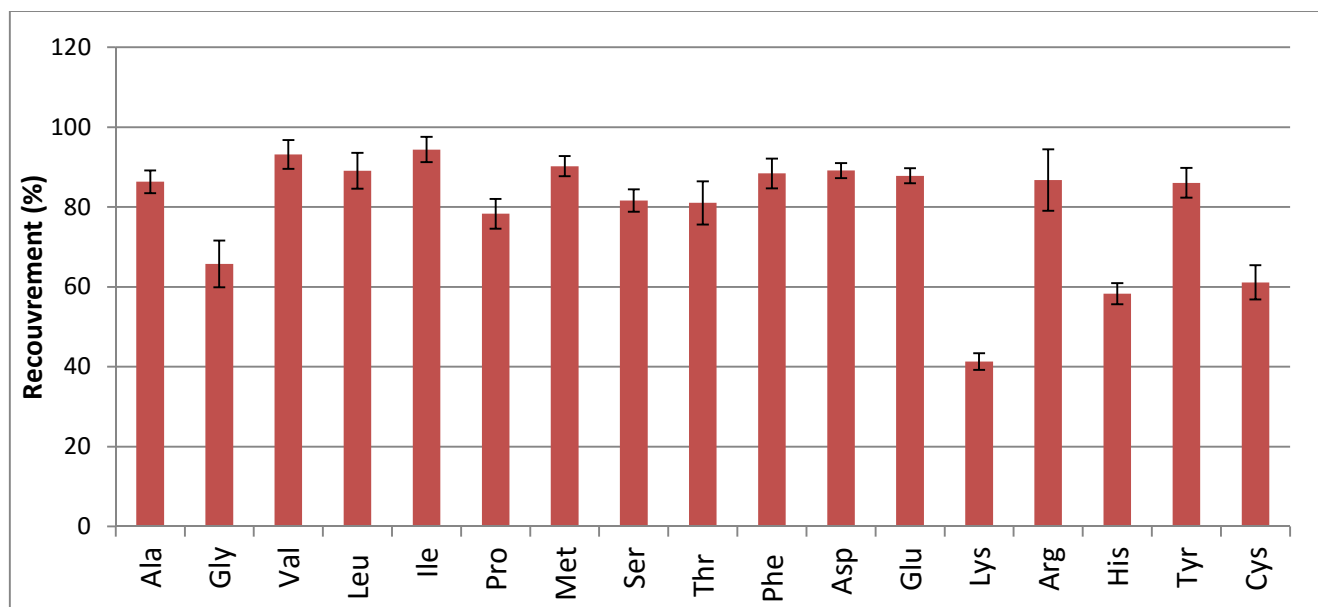


Figure III-5 : Pourcentage de recouvrement des acides aminés (par comparaison avec la référence)

Comment expliquer la diminution du rendement de la fonctionnalisation dans le cadre de cette expérience ? Concernant les facteurs potentiellement responsables d'une diminution du rendement de la fonctionnalisation, nous avons éliminé la famille de facteurs (ii), c'est-à-dire l'interaction entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation. Ainsi, ce résultat est explicable par une désactivation partielle du MTBSTFA lors du chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol. Il est possible que le MTBSTFA ait fonctionnalisé de l'eau ou des composés organiques (ou d'autres nucléophiles) présents dans le sol d'Atacama, ou encore qu'il ait été oxydé par des agents oxydants (oxydes de fer, perchlorates) et qu'il n'y avait plus de MTBSTFA en quantité suffisante pour fonctionnaliser la totalité des acides aminés. Il serait ainsi intéressant de contacter le sol d'Atacama avec un mélange MTBSTFA / DMF, afin d'y réaliser, *in situ*, la réaction de fonctionnalisation, dans le but de voir si on y détecte des composés organiques.

Pour résumer, les deux hypothèses investiguées étaient les suivantes :

- 1) la nature minéralogique de la matrice minérale va entraîner une diminution de rendement de la fonctionnalisation, cette diminution variant selon la nature minéralogique du sol.
- 2) en éliminant la famille de facteurs (ii), le rendement de fonctionnalisation est quand même réduit. Ce qui permettrait de prouver que la raison de la diminution de rendement provient de la famille de facteurs (i).

Grâce à cette expérience, nous avons donc confirmé la première hypothèse pour le sol d'Atacama. Ainsi, la présence de certaines espèces dans cet échantillon (provenant d'un sol reconnu pour sa nature oxydante) semble bien entraîner une diminution du rendement de la fonctionnalisation, mais pas un rendement nul.

Nous avons également confirmé la deuxième hypothèse. Ainsi, nous pouvons affirmer que c'est la désactivation partielle du MTBSTFA lors du chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol d'Atacama (famille de facteurs (i)) qui a contribué à la diminution du rendement de la fonctionnalisation.

3.2.2.3) Smectite (Svalbard)

Après fonctionnalisation de la même quantité d'acides aminés (que la référence) avec le mélange MTBSTFA / DMF précédemment chauffé en présence du sol de Svalbard, on obtient le chromatogramme présenté en figure III-6. Tout comme pour Atacama, d'un point de vue qualitatif, l'ensemble des acides aminés sont détectés (figure III-6). Les rapports S/N sont du même ordre de grandeur que sur le chromatogramme de référence, et les temps de rétention correspondent.

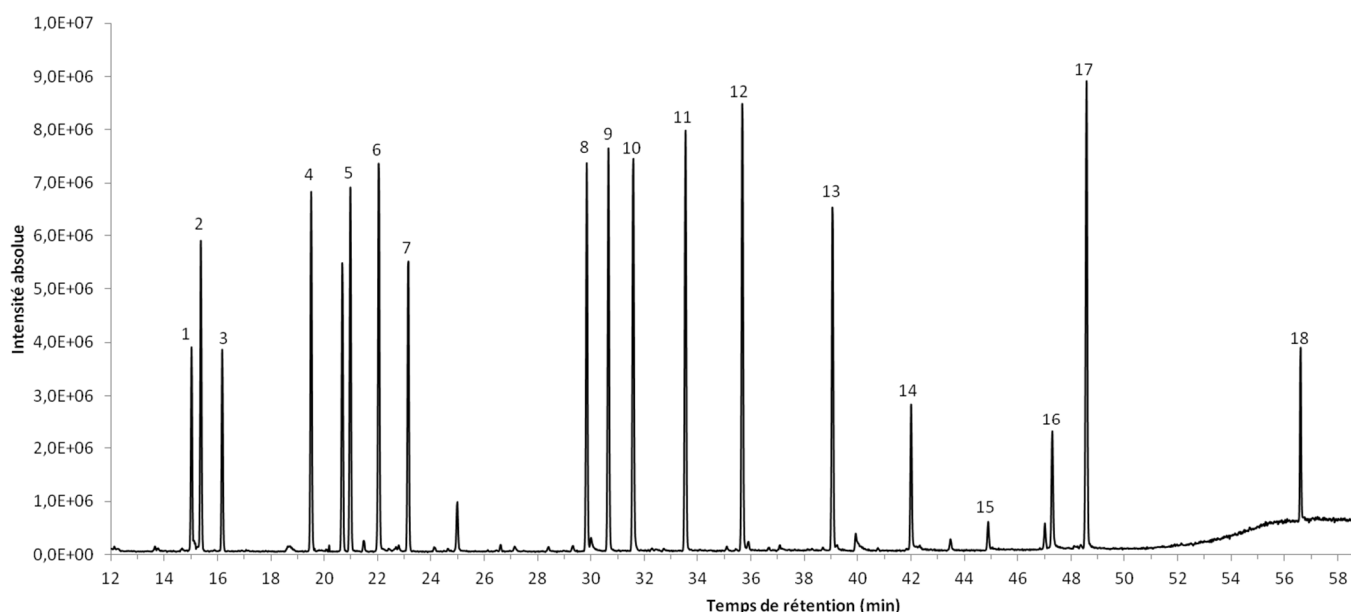


Figure III-6: Chromatogramme des acides aminés séparés, après fonctionnalisation avec un mélange MTBSTFA / DMF précédemment chauffé en présence d'un échantillon de Svalbard.

Fonctionnalisation avec 60 μ L de MTBSTFA, 20 μ L DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μ L du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, détecteur 200°C, colonne 120°C 10 min, rampe 3°C.min⁻¹ jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C.min⁻¹ jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C.

Gamme de détection : m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (methyl laurate), 2: L-Ala, 3: Gly, 4: L-Val, 5: L-Leu, 6: L-Ile, 7: L-Pro, 8: L-Met, 9: L-Ser, 10: L-Thr, 11: L-Phe, 12: L-Asp, 13: L-Glu, 14: L-Lys, 15: L-Tyr, 16: L-Cys.

L'analyse semi-quantitative du recouvrement (comparaison entre la référence et l'expérience sur Svalbard) des différents acides aminés montre que ce dernier varie de 62,5% (lysine) à 106,2% (isoleucine) (tableau III-2, figures III-7 et III-8). Seule la glycine semble avoir un rendement de fonctionnalisation plus faible que lors de la fonctionnalisation sur la solution

standard (référence). Les valeurs supérieures à 100% peuvent être attribuées aux erreurs de mesure ou variabilité entre réplicats.

Acide aminé	Référence		Svalbard			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	1,63	6,02	1,60	2,09	98,23	2,06
Glycine	1,32	8,91	1,09	6,66	82,17	5,48
Valine	1,87	7,71	1,96	2,45	104,43	2,56
Leucine	2,00	8,97	2,01	2,77	100,75	2,79
Isoleucine	2,11	9,92	2,24	1,61	106,22	1,71
Proline	1,82	10,21	1,72	4,04	94,39	3,81
Methionine	2,05	14,29	2,12	4,63	103,36	4,78
Sérine	2,44	14,50	2,32	5,70	95,39	5,44
Thréonine	2,57	15,81	2,61	10,13	101,74	10,31
Phénylalanine	2,42	17,20	2,45	4,82	101,59	4,90
Acide aspartique	2,61	19,09	2,64	6,57	101,33	6,66
Acide glutamique	2,08	22,68	2,05	5,56	98,63	5,48
Lysine	1,62	30,02	1,01	21,76	62,51	13,60
Arginine	0,24	76,50	0,24	50,46	101,10	51,02
Histidine	1,35	29,23	1,01	21,91	74,99	16,43
Tyrosine	3,15	23,25	3,02	3,82	96,02	3,67
Cystine	1,14	26,32	0,89	28,96	78,02	22,60

Tableau III-2 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol de Svalbard. Le pourcentage de recouvrement, ainsi que son écart-type, est donné pour l'expérience sur le sol de Svalbard.

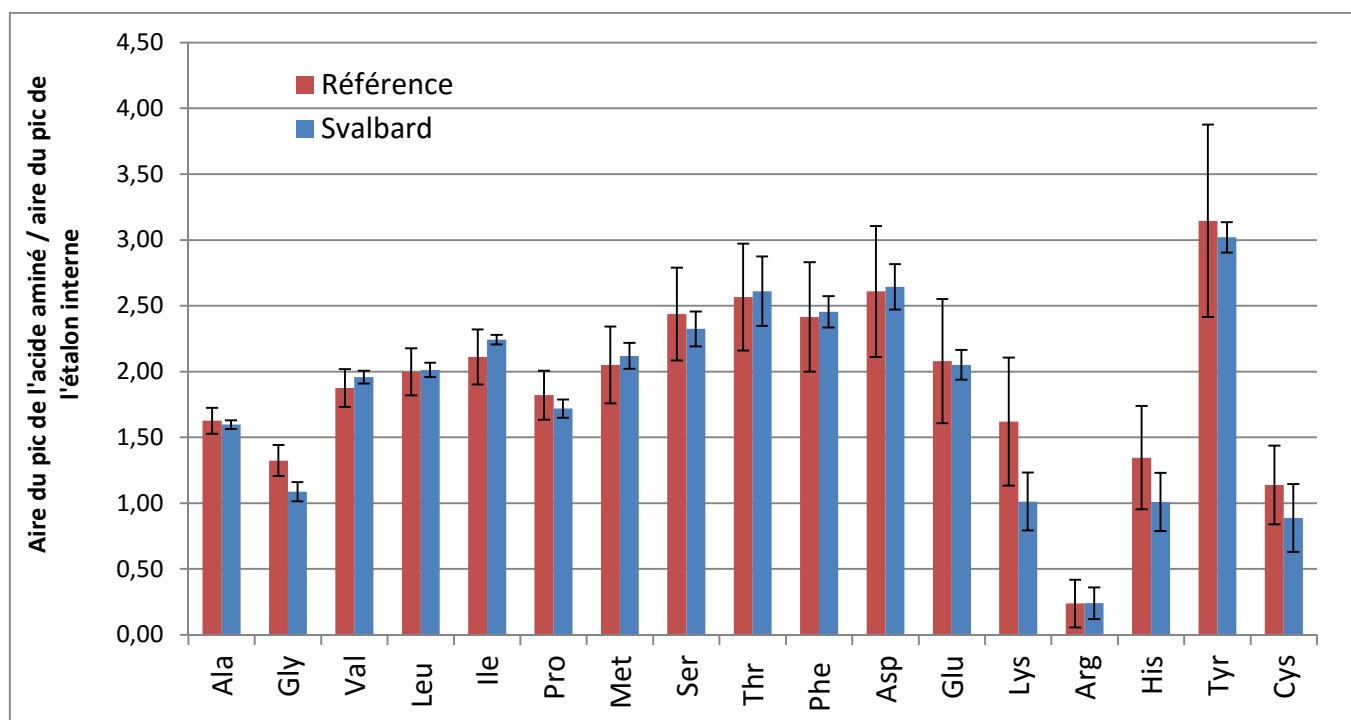


Figure III-7: Quantités d'acides aminés avec ou sans chauffage préalable de la solution de MTBSTFA / DMF au contact de l'échantillon du Svalbard

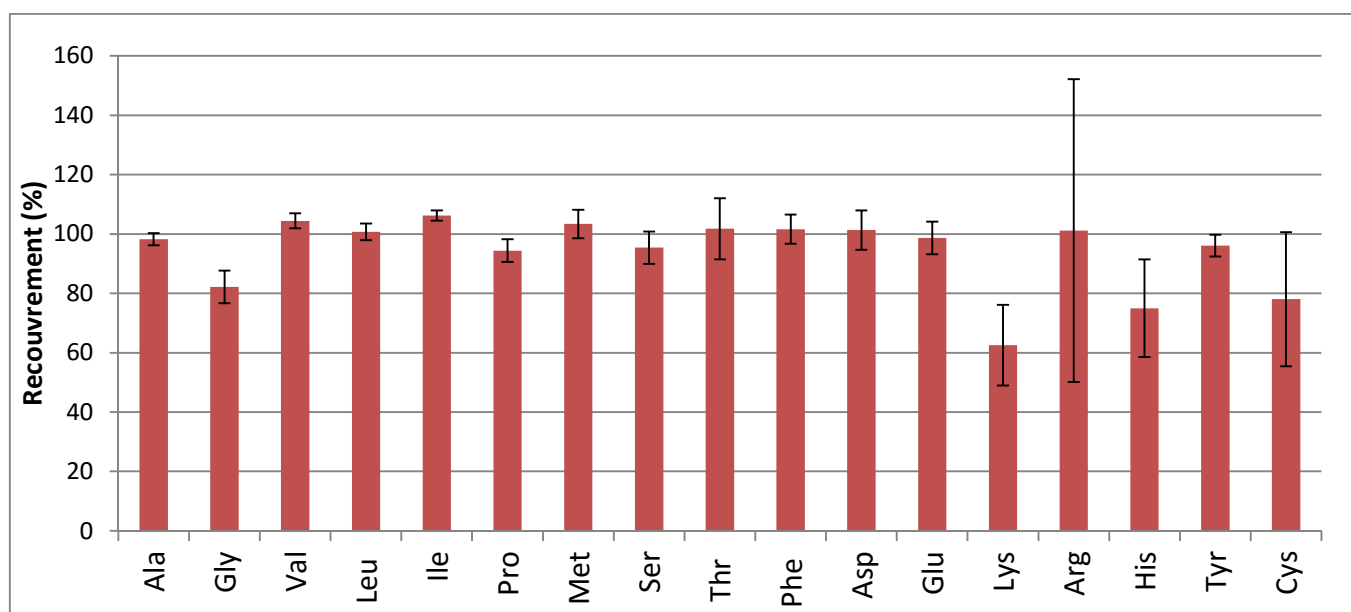


Figure III-8 : Pourcentage de recouvrement des acides aminés (par comparaison avec la référence)

Les résultats présentés ici sont qualitativement les mêmes que ceux obtenus lors de l'expérience sur Atacama. La différence étant, cette fois-ci, que seulement pour la glycine les écart-types de la référence et de l'expérience ne se recouvrent pas (ainsi, seulement pour la glycine nous pouvons affirmer avec certitude que le rendement de fonctionnalisation est plus

faible que lors de la fonctionnalisation de l'échantillon de référence). Ainsi, les résultats peuvent être expliqués de la même manière que pour l'échantillon de sol d'Atacama, c'est-à-dire par une désactivation partielle du MTBSTFA lors du chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol.

Pour résumer, grâce à cette expérience, nous avons donc confirmé la première hypothèse pour le sol du Svalbard. Ainsi, la présence d'un minéral hydraté (phyllosilicate), principal constituant de notre échantillon de sol du Svalbard, semble bien entraîner une diminution du rendement de la fonctionnalisation (avec certitude uniquement pour la glycine), mais pas un rendement nul. Ce résultat est intéressant dans le cadre de la recherche d'acides aminés sur Mars, puisque des phyllosilicates (dont des smectites) y ont été détectés, y compris au sein du cratère Gale (site d'atterrissage et d'investigation du rover Curiosity, mission MSL; cf. Vaniman et al., 2014). Les phyllosilicates sont d'autant plus importants dans le cadre de ces investigations, puisqu'ils sont également la preuve que de l'eau a coulé sur Mars à une époque où les conditions étaient propices à l'apparition de la vie. Ils sont également capables de conserver des bioindices.

Nous avons également confirmé la deuxième hypothèse. Ainsi, nous confirmons plus avant, avec un nouvel exemple, que c'est la désactivation partielle du MTBSTFA lors du chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol de Svalbard (famille de facteurs (i)) qui a contribué à la diminution du rendement de la fonctionnalisation.

3.2.2.4) Sulfates hydratés (Rio Tinto)

Après fonctionnalisation de la même quantité d'acides aminés (que la référence) avec le mélange MTBSTFA / DMF précédemment chauffé en présence du sol de Rio Tinto, le résultat est qualitativement très différent des tests sur les deux autres sols : aucun acide aminé n'a été détecté (figure III-9). Le pic présent à $t_R = 20,51$ est un pic non-identifié (déjà discuté au chapitre II, paragraphe 2.2.3.4) qui est également présent dans tous les autres chromatogrammes.

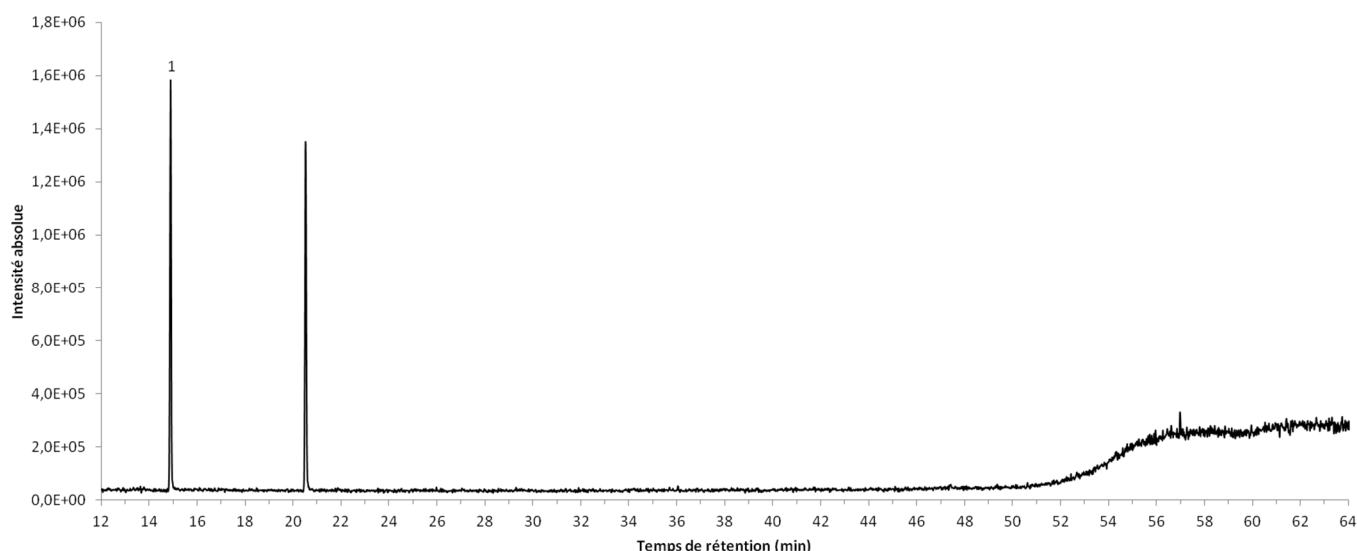


Figure III-9: Chromatogramme des acides aminés séparés, après fonctionnalisation avec un mélange MTBSTFA / DMF précédemment chauffé en présence d'un échantillon de Rio Tinto.

Fonctionnalisation avec 60 μL de MTBSTFA, 20 μL DMF, 15 min à 75°C. Injection de 0,5 μL du mélange. Paramètres CPG: injecteur 250°C, split mode 1/20, détecteur 200°C, colonne 120°C 10 min, rampe 3°C.min⁻¹ jusqu'à 250°C, deuxième rampe 10°C.min⁻¹ jusqu'à 300°C, isotherme 5 min à 300°C.

Gamme de détection, m/z de 50 à 650 u.

1: Etalon interne (laurate de méthyle).

Cette non-détection des acides aminés, traduisant un rendement de fonctionnalisation nul, peut s'expliquer par la désactivation de la totalité du MTBSTFA lors du chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol. Cette désactivation serait causée par la réaction du MTBSTFA, par exemple avec de l'eau ou des sels (en l'occurrence les sulfates de l'échantillon), c'est-à-dire n'importe quelle espèce capable d'agir en tant que nucléophile à la place des groupements amines et carboxyles des acides aminés.

Grâce à cette expérience, nous avons donc confirmé la première hypothèse pour le sol de Rio Tinto. Ainsi, la présence de sels hydratés (sulfates hydratés) dans le sol de Rio Tinto semble bien entraîner une diminution du rendement de la fonctionnalisation, au point d'entraîner un rendement nul. Ce résultat confirme également le résultat de Stalport *et al.* (2012), qui n'avaient pas détecté de molécules organiques dans cet échantillon après fonctionnalisation au MTBSTFA, alors que l'échantillon est connu pour en contenir (Stockton *et al.*, 2009 ; dans Stalport *et al.*, 2012). En effet, Stockton *et al.* (2009) ont réalisé des analyses

par électrophorèse microcapillaire d'un extrait par eau sous-critique de cet échantillon de Rio Tinto (nommé KF03-A dans leur étude), et y ont détecté des molécules organiques à des concentrations de l'ordre du ppt (partie par trillion, « parts-per-trillion » en Anglais) (éthylamine, sérine et glycine ; ainsi que l'ammoniac NH_3) et de l'ordre du ppb (méthylamine, valine, alanine et acide aspartique).

Il est intéressant de noter que la nature de l'échantillon de sol d'Atacama (sol analogue reconnu pour sa nature oxydante) et celle de l'échantillon de sol de Svalbard (présence de smectite, un minéral hydraté) n'avaient pas entraîné un rendement nul.

Cependant, notre connaissance limitée de l'effet des différentes matrices minéralogiques (par exemple, phyllosilicate contre sulfates hydratés) sur le rendement de la fonctionnalisation, ne nous permettent pas d'interpréter plus avant. Ce rendement de fonctionnalisation nul serait problématique dans le cadre de la recherche d'acides aminés dans des environnements martiens présentant ce profil minéralogique. Des sulfates ont été détectés sur Mars, et ils sont présents dans les environnements d'intérêt exobiologique (dont le cratère Gale ; cf. Vaniman *et al.*, 2014), puisqu'ils sont la preuve que de l'eau a coulé sur Mars (bien que dans un environnement moins propice à la vie que celui dans lequel les phyllosilicates se sont formés).

Nous avons également confirmé la deuxième hypothèse. Ainsi, nous pouvons affirmer une fois encore que c'est la désactivation du MTBSTFA lors du chauffage du mélange MTBSTFA / DMF en présence du sol de Rio Tinto (famille de facteurs (i)), qui a contribué à la diminution du rendement de la fonctionnalisation, et plus particulièrement dans ce cas, d'un rendement nul.

3.3.3) Conclusion

Les deux hypothèses de cette première partie du chapitre III étaient les suivantes :

1) la nature minéralogique de la matrice minérale va entraîner une diminution de rendement de la fonctionnalisation, cette diminution variant selon la nature minéralogique du sol. Nous avons confirmé cette hypothèse, en montrant que les trois types de minéralogies différents avaient tous entraîné une diminution du rendement de la fonctionnalisation. De plus, nous avons montré que cette diminution de rendement était variable selon la nature

minéralogique du sol, avec un rendement minimal (nul) en présence de sulfates hydratés (Rio Tinto), un rendement compris entre 62,5% et 106,2% en présence de smectite (une argile, faisant partie des phyllosilicates) (Svalbard), et un rendement compris entre 41,3% et 94,4% en présence d'un échantillon de sol provenant d'un analogue reconnu pour sa nature oxydante (Atacama).

2) en éliminant l'interaction directe entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation (c'est-à-dire la famille de facteurs (ii)), grâce à notre expérience qui nous évite de réaliser la fonctionnalisation directement sur le sol, le rendement de fonctionnalisation est quand même réduit. Ceci permettrait de prouver que la raison de la diminution de rendement provient de la famille de facteurs (i), c'est-à-dire une désactivation du MTBSTFA lors de son chauffage en présence du sol. Et en effet, lors de cette première partie, bien que la famille de facteurs (ii) ait été supprimée, nous avons observé une diminution de rendement dans l'ensemble des expériences. La réduction du rendement provient donc de la désactivation chimique du MTBSTFA au cours de son chauffage en présence du sol.

La figure III-10 permet de comparer les recouvrements (comparaison entre la référence et l'expérience) obtenus lors des différentes expériences. On peut voir que les recouvrements pour l'échantillon de Svalbard (constitué de smectite, un phyllosilicate) sont plus faibles que pour l'échantillon d'Atacama (échantillon provenant d'un sol reconnu pour sa nature oxydante). A ce stade de l'étude, nous ne connaissons pas la nature exacte de la minéralogie de l'échantillon d'Atacama, nous ne pouvons ainsi pas présager du caractère plus ou moins inhibiteur de ces deux sols sur la réaction fonctionnalisation. Nous pouvons seulement dire que la nature de la matrice minérale de l'échantillon d'Atacama (analogue reconnu pour sa nature oxydante) semble avoir un effet inhibiteur moins important sur la fonctionnalisation que la présence de minéraux hydratés. Quant au sol de Rio Tinto, on peut constater que la présence simultanée de sulfates hydratés a entraîné un rendement de fonctionnalisation nul.

Toutefois, nous pouvons comparer la nature minéralogique des sols de Svalbard et de Rio Tinto. L'échantillon de Svalbard est composé majoritairement de smectite, un minéral hydraté. C'est le cas aussi pour l'échantillon de Rio Tinto, constitué de sulfates hydratés. De plus, la smectite, une argile, est connue pour avoir la capacité d'absorber de l'eau entre ses

feuillets, eau facilement libérée lors d'un chauffage du minéral. Certains des sulfates hydratés de Rio Tinto possèdent également de l'eau facilement libérée : l'alunogène $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17(\text{H}_2\text{O})$, l'amarantite $\text{FeSO}_4\text{OH} \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ et la copiapite $\text{Fe}_5[\text{OH}(\text{SO}_4)_3]_2 \cdot 20(\text{H}_2\text{O})$. La différence entre ces deux échantillons (pouvant tous deux facilement libérer de l'eau lors d'un chauffage à faible température) est la nature du minéral : smectite pour Svalbard et sulfates pour Rio Tinto. La présence de sels (sulfates) dans l'échantillon de Rio Tinto pourrait donc jouer un rôle dans la non-détection des acides aminés. Cela pourrait également être dû au fait qu'un des deux échantillons contient plus d'eau facilement libérée. Il va donc falloir en apprendre plus sur le mécanisme de cette réduction du rendement de la fonctionnalisation. Pour ce faire, nous proposons de caractériser nos différents échantillons de sols, grâce à des techniques d'analyse thermique.

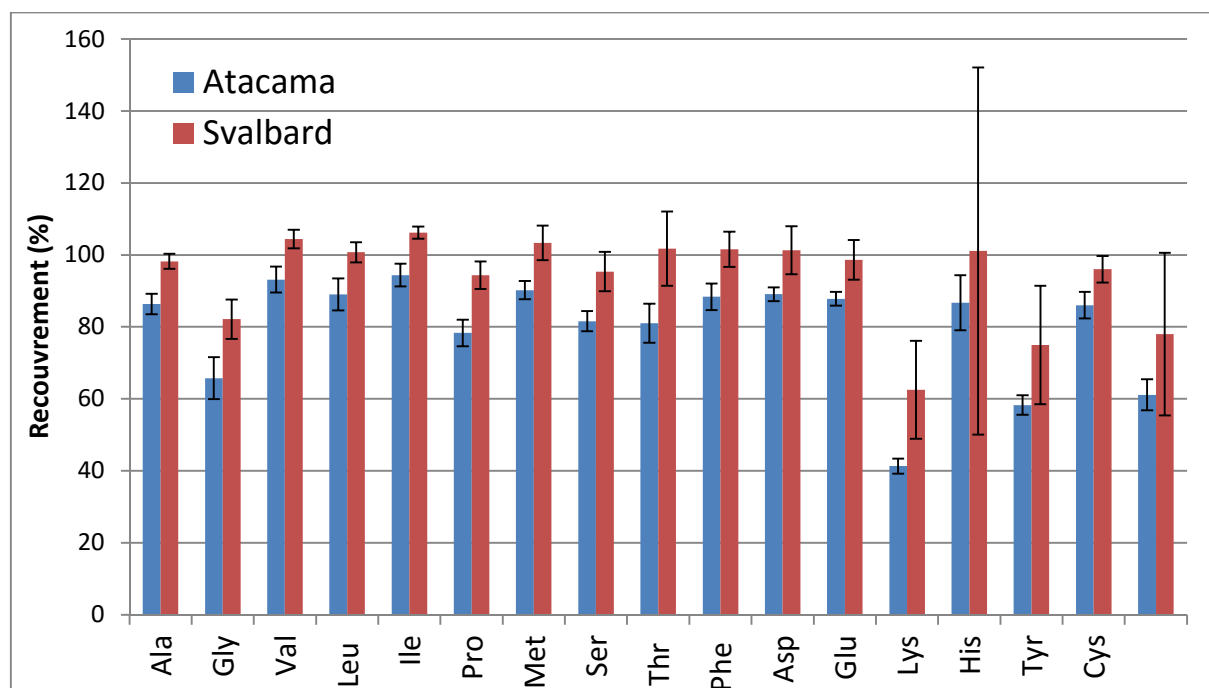


Figure III-10 : Recouvrement des acides aminés (comparaison avec la référence) pour Atacama et Svalbard. Les recouvrements pour Rio Tinto sont nuls.

3.4) 2^{ème} partie : caractérisation des analogues martiens

Afin de caractériser la minéralogie des analogues, nous les avons analysés, tout d'abord par analyse élémentaire, puis par thermogravimétrie couplée à la calorimétrie

différentielle à balayage et à la spectrométrie de masse (TG-DSC-MS). En effet, l'échantillon de Rio Tinto a entraîné lors de notre expérience un rendement de fonctionnalisation nul. De plus, cet échantillon est également connu pour avoir un effet inhibiteur sur le rendement de la fonctionnalisation au MTBSTFA (Stalport *et al.*, 2012). Nous avons donc voulu en savoir plus sur la différence entre Rio Tinto et les deux autres analogues, ainsi que la différence entre Svalbard et Atacama. Cette deuxième partie nous permettra également d'obtenir des informations qui pourraient nous indiquer quel(s) traitement(s) serai(en)t nécessaire(s) pour résoudre ce problème.

3.4.1) Analyse élémentaire

3.4.1.1) Matériel et méthodes

Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse élémentaire sur les échantillons de sol. En effet, obtenir les pourcentages en carbone, hydrogène, oxygène, azote et soufre (CHONS) de chaque sol nous permet d'obtenir des éléments de réponse quant à la composition minéralogique des échantillons. La présence d'eau dans l'échantillon nous intéresse également. L'utilisation de techniques telles que la Diffractométrie à Rayons X (DRX) aurait donc été limitée dans ce cas, ne permettant que l'analyse de la matière cristallisée.

L'analyse élémentaire a été réalisée avec un analyseur élémentaire FLASH 2000 de la marque Thermo Fisher. Le logiciel utilisé pour le traitement des données est Eager Xperience.

L'analyse des éléments C, H, N et S consiste en une combustion des échantillons dans un flux d'O₂. L'échantillon est pesé dans des capsules en étain. Des additifs peuvent être ajoutés aux capsules lorsque l'on souhaite empêcher la formation de carbures métalliques ou de carbures de silicium, et pour assister la combustion de certains matériaux, tels que des composés organométalliques ou inorganiques. Par exemple, le pentoxyde de vanadium (V₂O₅) permet d'assurer une conversion complète du soufre inorganique en SO₂ (Fujine, 2014).

Les capsules sont placées dans le carrousel automatisé de l'appareil (« MAS 200R autosampler »), qui dépose ensuite les échantillons dans un réacteur d'oxydation / réduction se trouvant à une température comprise entre 900 et 1000°C et balayé par un flux constant

de gaz inerte (hélium). La quantité exacte d'O₂ nécessaire pour la combustion optimale de l'échantillon est délivrée dans le réacteur de combustion à un instant précis. La réaction de l'O₂ avec la capsule en étain à température élevée génère une réaction exothermique qui augmente la température à 1800°C pendant quelques secondes (« flash combustion »). A cette température élevée, les substances (organiques et inorganiques) présentes dans l'échantillon sont converties en gaz élémentaires (N₂ et oxydes d'azote, CO₂, H₂O, SO₂) (si d'autres éléments – tels que le chlore – sont présents, ils seront également convertis en produits de combustion, tels que le chlorure d'hydrogène. Des absorbants sont utilisés pour éliminer ces produits de combustion additionnels). Les produits de la combustion sont balayés hors du réacteur par le gaz inerte et passent au-dessus de cuivre chauffé (600°C). La fonction du cuivre est d'éliminer tout oxygène non consommé lors de la combustion, et de convertir tout oxyde d'azote potentiellement présent en N₂. Les gaz sont ensuite passés à travers un piège absorbant afin de ne laisser que le N₂, CO₂, H₂O et SO₂. Ensuite, les gaz sont séparés sur une colonne chromatographique, et enfin détectés par un détecteur à conductivité thermique (« Thermal Conductivity Detector », TCD) (figure III-11).

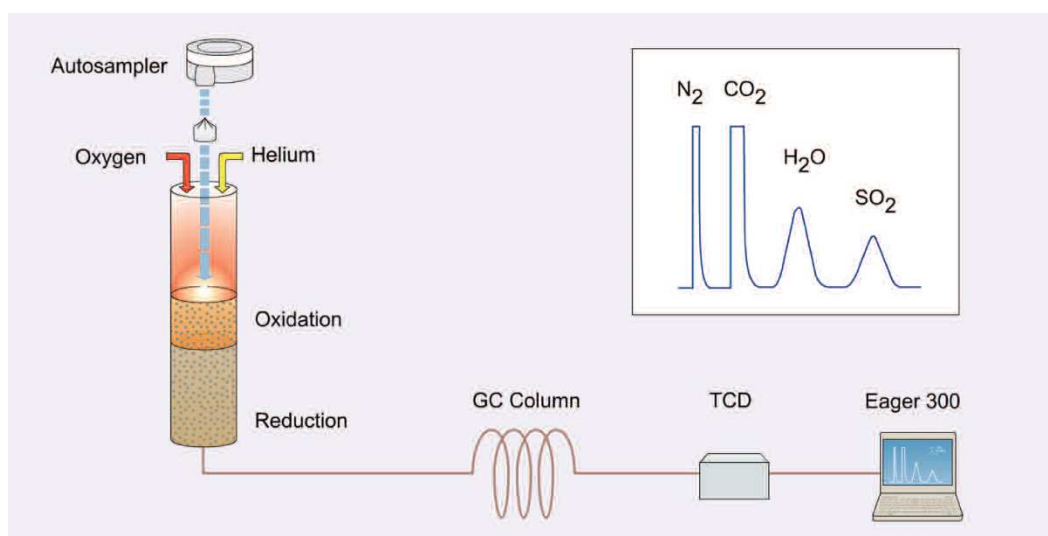


Figure III-11 : principe de l'analyse des éléments C, H, N et S

La quantification de l'élément oxygène est réalisée grâce à un réacteur de pyrolyse spécifique à ce dernier, chauffé à une température légèrement supérieure à 1060°C, et balayé par un flux constant d'hélium. Ceci permet la pyrolyse complète de l'échantillon dans un environnement dépourvu d'oxydants. Les échantillons sont pesés dans des capsules en argent

(probablement car en général, les capsules en argent contiennent moins d'oxygène détectable que celles en étain [Wang *et al.*, 2008], limitant ainsi la contamination lors de la mesure). Des additifs peuvent être ajoutés à la capsule lorsque la réduction d'oxydes métalliques est requise. Lorsque la capsule est déposée dans le réacteur, l'échantillon est instantanément pyrolysé. Les gaz pyrolysés résultants sont passés à travers un catalyseur (« nickel coated carbon »), ce qui permet la conversion complète de tout gaz contenant de l'oxygène en monoxyde de carbone CO. Le monoxyde de carbone est séparé des autres gaz pyrolysés sur une colonne chromatographique, et mesuré quantitativement par un TCD (figure III-12).

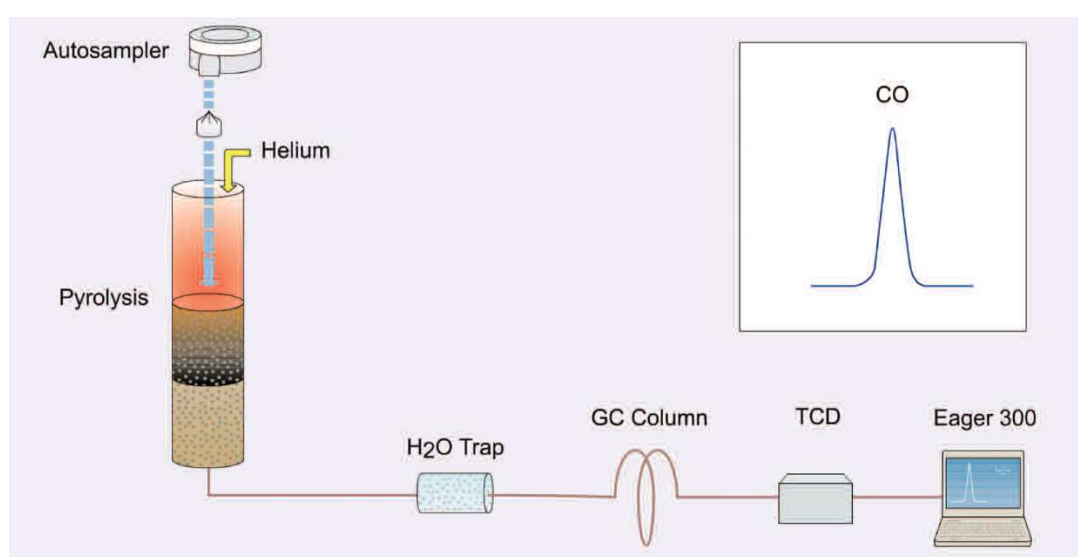


Figure III-12 : principe de l'analyse de l'élément O

Après détection par le TCD, l'aire des pics chromatographiques est mesurée. A partir de ces valeurs, l'emploi de méthodes de calibration adaptées (à l'aide de standards) permet l'obtention de courbes de calibration, et permet ainsi de déterminer le pourcentage en CHONS de l'échantillon (en pourcentage de la masse totale). La calibration est nécessaire car la réponse du détecteur varie d'un composé à l'autre. Les méthodes de calibration emploient toutes l'analyse de quantités connues d'un standard (ou étalon). Trois méthodes de calibration peuvent être employées : facteur K moyen (« averaged k-factor »), régression linéaire, et régression quadratique.

Analyse des éléments C, H, N et S

Pour l'analyse CHNS, nous avons utilisé la méthode de calibration intitulée « facteur K moyen ». La quantification des éléments (C, H, N, S) est réalisée en comparant les valeurs obtenues par l'analyse de l'échantillon et celles obtenues par l'analyse d'un standard, et par l'usage d'un facteur de référence appelé « facteur K ». Le standard employé est la cystine de formule $C_6H_{12}NO_4S_2$, qui contient (en pourcentage massique théorique) 29.99% de carbone, 5.03% d'hydrogène, 11.66% d'azote, 26.63% d'oxygène, et 26.69% de soufre. Nous avons ajouté du V_2O_5 à l'ensemble de nos prises d'essai (nous n'en avons pas ajouté aux blancs).

Le facteur K est calculé grâce à l'équation suivante :

$$K = \frac{m_{\text{std}} \times \%T_{\text{std}}}{\text{Aire}_{\text{std}} - \text{Aire}_{\text{blc}}}$$

Avec : m_{std} la masse du standard

$\%T_{\text{std}}$ le pourcentage théorique du standard

Aire_{std} l'aire du pic du standard

Aire_{blc} l'aire du pic du blanc

Le calcul du pourcentage en élément est réalisé grâce à l'équation suivante :

$$\% \text{ calculé} = \frac{K \times (\text{Aire}_{\text{inc}} - \text{Aire}_{\text{blc}})}{m_{\text{inc}}}$$

Avec : K le facteur K moyen

Aire_{inc} l'aire du pic de l'échantillon analysé (inconnu)

Aire_{blc} l'aire du pic du blanc

m_{inc} la masse de l'échantillon analysé (inconnu)

Prenons l'exemple de l'élément C. Lors de notre analyse, nous avons passé deux échantillons du standard cystine. Le pourcentage théorique de l'élément C au sein de la cystine est de 29,99%. Le premier échantillon de cystine a pour masse 0,363 mg. La mesure de l'aire du pic du carbone a donné une valeur de 490741 (dimension sans unité). L'aire du pic du carbone du blanc (nacelle vide) est de 4685.

Ainsi,

$$K = \frac{0.363 \times 29,99}{490741 - 4685} = 2,23974 \cdot 10^{-5}$$

Le second échantillon de cystine a pour masse 0,423 mg, avec une aire mesurée du pic du carbone de valeur 575721. Selon la même équation que ci-dessus, le facteur K calculé est de $2,2254 \cdot 10^{-5}$.

Le facteur K moyen est donc de $2,23064 \cdot 10^{-5}$.

Le premier échantillon d'Atacama analysé a pour masse 7,949 mg. L'aire du pic du carbone a pour valeur 125131. Ainsi,

$$\%C = \frac{2.23064 \cdot 10^{-5} \times (125131 - 4685)}{7,949} = 0,34\%$$

Le pourcentage calculé de carbone au sein de l'échantillon d'Atacama analysé est donc de 0,34%. Le même calcul a été réalisé pour tous les échantillons analysés, permettant de déterminer leurs pourcentages en C, H, N et S.

Analyse de l'élément O

Pour l'analyse de l'O, nous avons utilisé la méthode de calibration par régression linéaire, car nous disposons de plus de valeurs de standard. Dans cette méthode (calibration par régression linéaire), au moins deux échantillons d'un étalon interne sont analysés. Une régression linéaire par la méthode des moindres carrés est appliquée aux résultats. Graphiquement, cela équivaut à faire passer une droite par le nuage de points. L'équation de cette droite est déterminée. Ensuite, la masse de l'élément, et par conséquent son pourcentage au sein de l'échantillon, sont déterminés en fonction de l'aire (mesurée) du pic de l'oxygène (figure III-13).

Les standards utilisés ici sont la cystine, le BBOT (2,5-Bis(5-tert-butyl-2-benzo-oxazol-2-yl) thiophène), et le sulphanilamide. Ils contiennent des pourcentages en CHNS différents, ce qui permet d'obtenir une gamme d'étalonnage couvrant l'intégralité des pourcentages étudiés.

Les pourcentages en éléments de la cystine sont donnés plus avant. Le BBOT contient (en pourcentage massique théorique) 72.52% de carbone, 6.09% d'hydrogène, 6.51% d'azote, 7.43% d'oxygène, et 7.44% de soufre. Finalement, le sulphanilamide contient (toujours en pourcentage massique théorique) 41.85% de carbone, 4.68% d'hydrogène, 16.27% d'azote, 18.58% d'oxygène, et 18.62% de soufre.

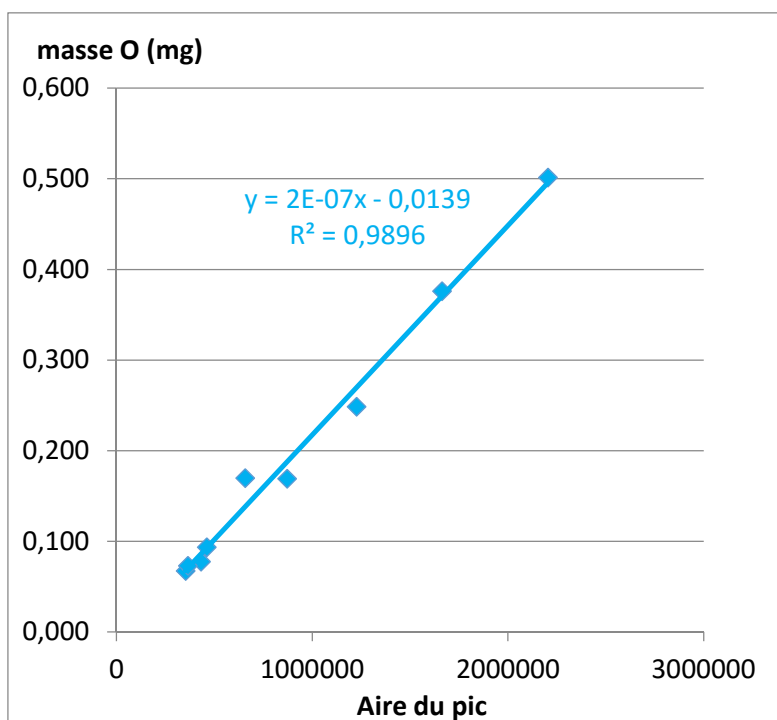


Figure III-13: droite d'étalonnage utilisée pour quantifier l'élément O

3.4.1.2) Résultats et discussion

Chaque valeur présentée ici (tableau III-3) correspond à la moyenne du pourcentage résultant de l'analyse de deux échantillons du même sol.

Les résultats de l'analyse élémentaire, en pourcentages massiques par rapport à la masse totale (%w/wt) sont présentés dans le tableau III-3 et les figures III-14, III-15 et III-16 (pour les sols d'Atacama, Svalbard et Rio Tinto, respectivement). La figure III-17 permet de comparer les teneurs en éléments entre les trois analogues.

Echantillon	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	O (%)
Atacama	N/A	0,34	0,49	N/A	0,50
Svalbard	N/A	1,24	0,24	N/A	1,86
Rio Tinto	N/A	0,53	3,26	12,83	20,88

Tableau III-3: pourcentages des éléments N, C, H, S et O mesurés dans les trois analogues

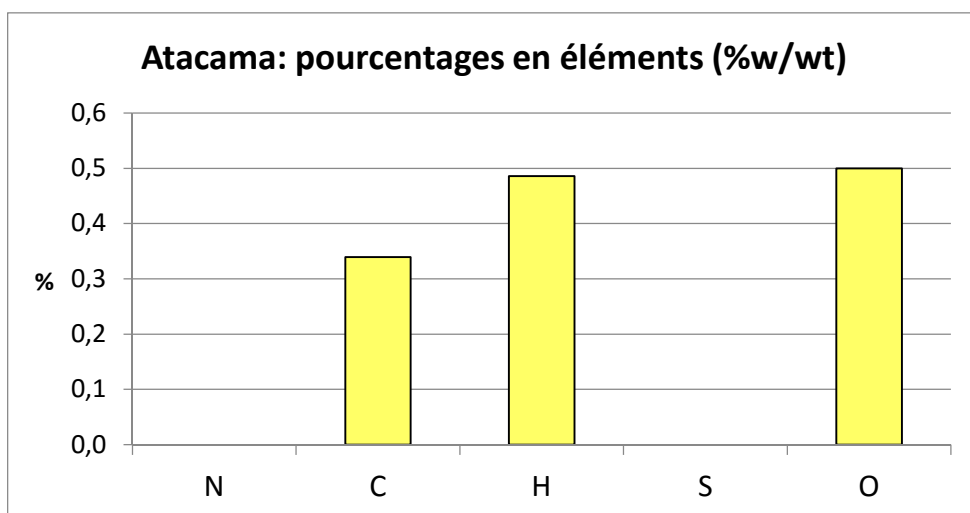


Figure III-14: analyse élémentaire d'Atacama, montrant les pourcentages en éléments par rapport à la masse totale

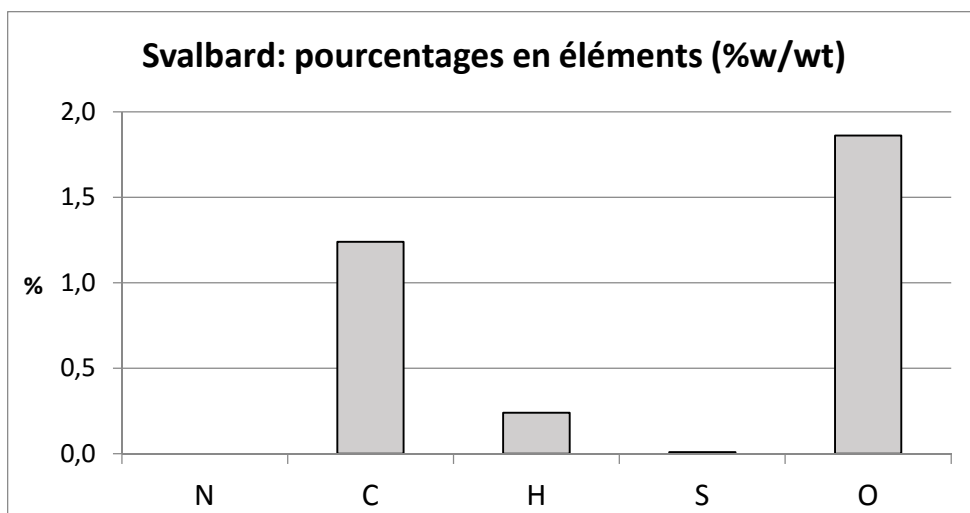


Figure III-15: analyse élémentaire de Svalbard, montrant les pourcentages en éléments par rapport à la masse totale

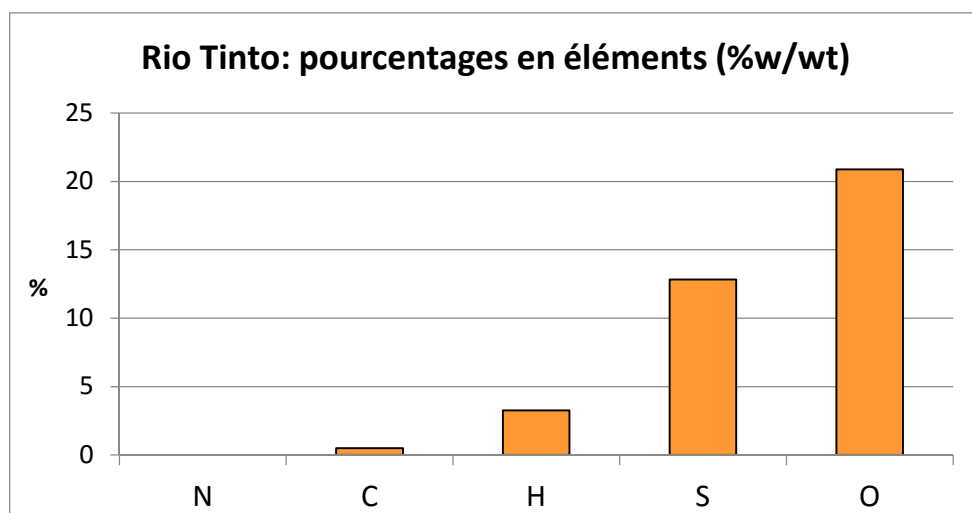


Figure III-16: analyse élémentaire de Rio Tinto, montrant les pourcentages en éléments par rapport à la masse totale

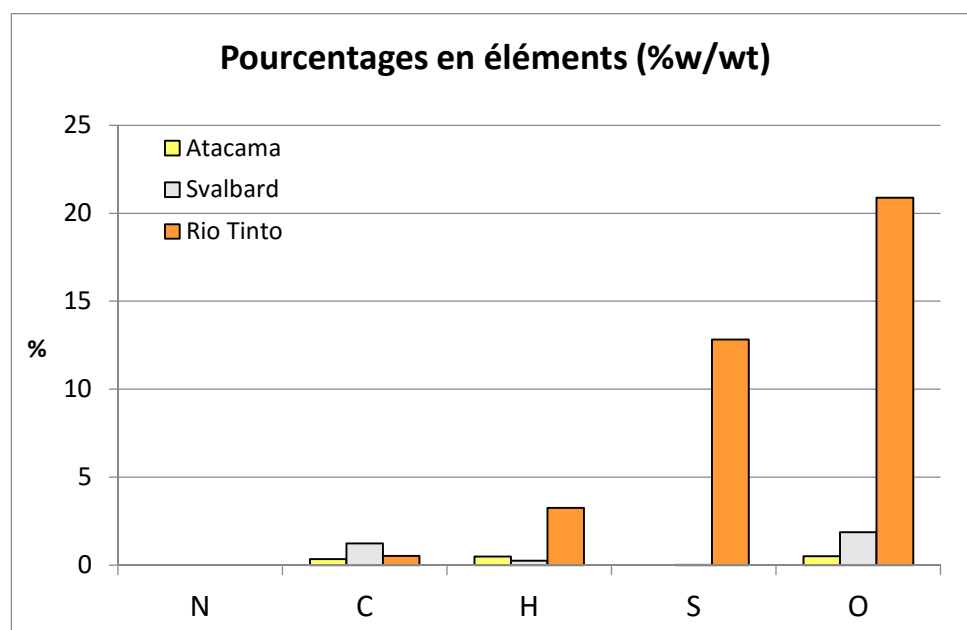


Figure III-17: résultats de l'analyse élémentaire, montrant les pourcentages en éléments C, H, N, S et O des trois échantillons d'analogues martiens analysés

Aucun des trois analogues ne contenait d'azote au-dessus de la limite de détection de l'appareil. L'échantillon d'Atacama ne contenait pas de soufre au-dessus de la limite de détection. Les limites de détection pour les quantités en N et S, pour l'appareil utilisé sont respectivement de 0,5 μg et 1 μg (Chevalier, communication personnelle).

Un autre échantillon de Svalbard (AM11-129, par contraste avec l'échantillon AM11-155 utilisé au cours de cette thèse) a été analysé et ses teneurs en éléments sont du même ordre de grandeur (%N = 0,02 ; %C = 2,95 ; %H = 0,37 ; %S = N/A ; %O = 5,71).

L'échantillon de Rio Tinto possède des pourcentages en H, S et O plus élevés que les deux autres analogues. Il est intéressant de noter le pourcentage de S qui est bien plus élevé que dans le cas de Svalbard (Atacama n'en contenant pas). Ces pourcentages élevés en S et en O pour Rio Tinto peuvent s'expliquer par la présence de sulfates (ions SO_4^{2-}), ainsi que par la présence d'eau. Et en effet, des sulfates hydratés ont été détectés dans cet échantillon de Rio Tinto (*cf.* Stalport *et al.*, 2012). Une présence d'eau plus abondante au sein de Rio Tinto pourrait expliquer le % en H plus élevé que dans les autres sols. Ceci est un premier indice pour comprendre le mécanisme de réduction du rendement de la fonctionnalisation : le sol pour lequel les acides aminés n'ont pas été détectés est Rio Tinto, or celui-ci possède des sulfates hydratés, et pourrait posséder de l'eau en plus grande quantité que les deux autres. Afin de creuser plus avant cette hypothèse, nous allons réaliser des analyses de thermogravimétrie.

3.4.2) Thermogravimétrie couplée à la calorimétrie différentielle à balayage et à la spectrométrie de masse (TG-DSC-MS)

3.4.2.1) Introduction

Notre objectif est de découvrir par quel mécanisme la nature minéralogique de certains types de sol provoque une réduction de rendement de fonctionnalisation et de proposer une solution pour pallier ce problème. Pour ce faire, il paraît utile d'analyser le comportement des sols au cours de leur chauffage, et de les comparer. De plus, nous pourrions obtenir des informations quant à la minéralogie de l'échantillon de sol d'Atacama, qui nous est pour l'instant inconnue.

Selon la définition de l'union internationale pour la chimie pure et appliquée (« International Union of Pure and Applied Chemistry », IUPAC), l'analyse thermique regroupe les « techniques par lesquelles une propriété physique d'une substance est mesurée en

fonction de la température, lors de l'application à la substance d'un programme de température contrôlé ». Plus précisément, ces techniques peuvent être définies comme des méthodes expérimentales pour caractériser un système (élément, composé ou mélange) en mesurant les changements de propriétés physico-chimiques à des températures élevées en fonction d'un accroissement de température (Coats and Redfern, 1963). Les changements dans les propriétés de l'échantillon peuvent être associées à l'état de l'échantillon (température, masse, volume), à des processus (par exemple la chaleur de transition), ou des propriétés de l'échantillon (par exemple, la capacité de chaleur, la composition chimique, ou la structure cristalline). Ces changements peuvent se dérouler à une température (de l'échantillon) constante ou variable, et sont habituellement associés à des effets thermiques qui génèrent ou consomment de la chaleur. Le programme de température contrôlée peut impliquer le chauffage ou refroidissement à un taux de changement de température fixe ou variable, ou le maintien d'une température constante (isotherme), ou n'importe quelle séquence de ces derniers. Les changements dans les propriétés de l'échantillon sont détectés et mesurés par des détecteurs et transformés en signal électrique (Karathanasis, 2008).

Par exemple, la ThermoGravimétrie (TG), la calorimétrie différentielle à balayage (« Differential Scanning Calorimetry » DSC), ou encore l'analyse différentielle thermique (« Differential Thermal Analysis » DTA) sont toutes trois des techniques d'analyse thermique.

L'analyse thermique permet de détecter les effets thermiques (grâce à la DSC / DTA) et les pertes de masse (grâce à la TG) qui accompagnent la libération de gaz ou de vapeur lors du chauffage d'un échantillon. Cependant, ces techniques ne permettent pas la détection et l'identification du gaz libéré. Afin de pallier ce manquement, la technique d'analyse thermique peut-être couplée avec une technique permettant la détection et l'identification du gaz libéré. Dans ce cas, la technique permettant la détection et l'identification sera qualifiée de technique d'analyse des gaz libérés (plus connue sous le nom de « Evolved Gas Analysis », EGA) (les techniques permettant uniquement la détection, sans identification, sont qualifiées de « Evolved Gas Detection », EGD). Des techniques couramment utilisées en analyse des gaz libérés incluent la spectrométrie de masse (SM) ou la spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF) (Brown, 2004). De cette manière, lors du chauffage de l'échantillon, en plus de la nature de la réaction en cours (exothermique ou endothermique, renseigné par la DSC ou la DTA) et de la masse d'échantillon perdue (renseignée par la TG), l'identification des gaz libérés au cours du gradient de température devient possible.

L'analyse thermique peut être utilisée pour caractériser des échantillons de sol. Beaucoup de constituants des sols subissent des réactions et transitions thermiques à des régions de températures spécifiques lors du chauffage, qui peuvent servir de propriétés diagnostiques pour leur identification et quantification. Certaines de ces réactions, telles que la déshydratation et l'évaporation d'eau sorbée, se déroulent à des températures basses (20 – 300°C). D'autres réactions, comme la déshydroxylation (perte du groupement OH de la structure cristalline) ou la décarbonatation (conversion de CO_3^{2-} en CO_2), se déroulent habituellement à des températures plus élevées, en général au-dessus de 250°C. Les échantillons contenant des composés organiques réduits ou des composés métalliques peuvent subir un changement de l'état d'oxydation dans des gammes de températures intermédiaires (250 – 500°C). Les réactions thermiques peuvent être endothermiques (gain de chaleur) ou exothermiques (perte de chaleur), et peuvent être associées à des changements de phase ou de structure cristalline (Karathanasis, 2008).

La perte d'eau est la transition principale que la plupart des minéraux du sol subissent lors de leur chauffage. L'eau peut être présente sous différentes formes et retenue avec différentes énergies sur les minéraux du sol (Karathanasis, 2008).

Les différents types d'eau du sol

Avant de poursuivre plus avant, il semble donc nécessaire de définir les différents types d'eau contenus dans le sol. D'un point de vue structurel, l'eau du sol peut être classifiée selon (figure III-18) (Punmia and Jain, 2005):

(i) L'eau de porosité : c'est l'eau contenue dans les pores du sol, essentiellement libre des forces d'attraction exercées par le sol. Elle comprend l'eau de gravitation (c'est l'eau soumise à nulle autre force que la gravité, qui comble les pores lorsque le sol est saturé en eau) et l'eau de capillarité (retenue et suspendue au sein des pores par la tension de surface).

(ii) L'eau adsorbée : c'est l'eau entourant la surface des grains sous la forme d'un film fin. Elle est retenue par des forces moléculaires appelées les forces d'adhésion. On distingue l'eau hygroscopique (affectée ni par la gravité ni par les forces capillaires) et l'eau pelliculaire (également retenue par des forces moléculaires, mais de moindre intensité que dans le cas de l'eau hygroscopique). Ces définitions peuvent varier selon les auteurs.

(iii) L'eau de solvatation : c'est l'eau qui forme une couche de solvatation (ou hydratation) autour des grains (probablement d'une épaisseur ne dépassant pas 200 molécules). Elle est sujette à des forces de liaison polaires, électrostatiques et ioniques. Elle reste mobile lorsqu'elle est soumise à des forces hydrodynamiques.

(iv) L'eau de structure : c'est l'eau chimiquement combinée dans la structure cristalline des minéraux du sol. Elle fait référence aux groupements hydroxyles OH présents dans la structure cristalline. Elle ne peut pas être éliminée en chauffant à des températures faibles (par exemple 105 – 110°C). Son élimination implique la destruction de la structure cristalline.

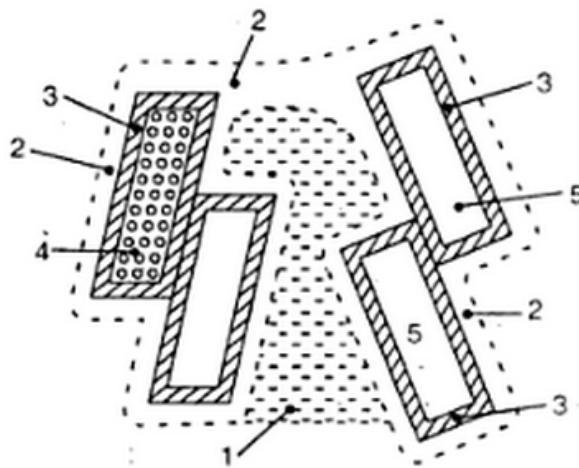


Figure III-18: classification structurelle de l'eau du sol (dans Punmia and Jain, 2005).

1 : eau de porosité ; 2 : eau adsorbée ; 3 : eau de solvatation ; 4 : eau de structure ; 5 : particule solide.

Selon Karathanasis (2008), l'eau sorbée (ou eau adsorbée) est présente en tant que films adsorbés sur les surfaces externes et/ou internes des particules minérales, et les vides de ces dernières, ainsi que dans les couches d'hydratation des cations échangeables. Ce type d'eau est retenu avec une énergie relativement faible, et est facilement perdue lors du chauffage dans des régions de température faible. La perte d'eau lors du chauffage à faible température est généralement réversible et sans conséquence permanente pour la plupart des structures minérales, bien qu'il existe des exceptions. La perte de l'eau adsorbée est principalement fonction de l'état d'hydratation et de l'énergie du cation saturant, et de la pression de vapeur de l'eau ou de l'humidité relative de l'environnement. Contrairement à ce type d'eau, les groupements hydroxyles OH (ou eau de structure) sont présents à des positions

fixes dans la structure cristalline, et leur enlèvement est accompagné par des changements irréversibles ou une destruction complète de la structure minérale. Les groupements OH sont retenus avec une plus grande énergie et sont généralement éliminés à de plus hautes températures que les autres formes d'eau. Puisque l'énergie (chaleur) nécessaire pour éliminer les groupements OH de la structure cristalline varie selon les minéraux, la réaction de déshydroxylation se déroule habituellement à différentes gammes de températures. Ceci permet de différencier, voire de caractériser les minéraux (Karathanasis, 2008).

Ainsi, pour résumer, et considérer ces informations d'un angle adapté à notre étude, on peut distinguer deux types d'eau :

(i) l'eau relâchée à de faibles températures. Elle comprend l'eau de porosité, l'eau adsorbée et l'eau de solvatation (hydratation). Par commodité, nous l'appellerons l'eau non-structurale. On peut y rajouter (*cf.* Leshin *et al.*, 2013) l'eau contenue entre les feuillets des phyllosilicates (par exemple l'argile smectite), ainsi que l'eau résultant de la déshydratation de certains sels (par exemple l'eau présente dans le gypse $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou eau de cristallisation), ou d'oxyhydroxides ferriques. Ces minéraux sont d'importance dans le cadre de la recherche de bioindices à la surface de Mars.

(ii) l'eau relâchée à de plus fortes températures. C'est l'eau de structure des minéraux, sous forme de groupements OH. Nous l'appellerons par la suite eau structurale.

Il semble également important d'attirer l'attention sur le fait qu'une confusion peut émerger quant à la dénomination de sulfate hydraté. Un sulfate hydraté peut être un sulfate contenant de l'eau non-structurale sous la forme « $\cdot n(\text{H}_2\text{O})$ » (eau de cristallisation), donc bien présente dans sa structure, mais pas structurale au sens où on l'entend ici (c'est-à-dire sous forme de groupements OH dans la structure du minéral). Un exemple en est l'alunogène $\text{Al}_2(\text{SO}_4) \cdot 17(\text{H}_2\text{O})$, qui, lors d'un chauffage, subira une déshydratation à faible température (perte de l'eau non-structurale indiquée dans la formule du minéral, c'est-à-dire H_2O). Un minéral tel que la jarosite $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ est également un sulfate hydraté, mais contient uniquement de l'eau structurale (groupement hydroxyle), eau qui sera libérée par déshydroxylation lors d'un chauffage à plus haute température. Un minéral tel que l'amarantite, dont la formule peut s'écrire $\text{FeSO}_4\text{OH} \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ (*e.g.* dans Stalport *et al.*, 2012), peut être considéré comme possédant ces deux types d'eau.

Notre objectif est de comprendre par quel mécanisme la nature minéralogique de certains types de sol provoque une réduction de rendement de la fonctionnalisation, et de proposer une solution adaptée à chaque minéralogie. L'utilisation combinée de ces trois techniques (TG, DSC et SM) nous permet ainsi de comparer le comportement des trois échantillons de sol au cours du chauffage, et donc de mieux cerner le mécanisme responsable de la diminution du rendement de la fonctionnalisation sur l'échantillon de Rio Tinto.

3.4.2.2) Matériel et méthodes

Thermogravimétrie

La ThermoGravimétrie (TG), ou encore Analyse ThermoGravimétrique (ATG), est une technique d'analyse thermique, et est définie par la confédération internationale pour l'analyse thermique et la calorimétrie (« International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry », ICTAC) comme « une technique par laquelle la masse d'une substance est mesurée en fonction de la température, lors de l'application à la substance d'un programme de température contrôlé » (Dunn, 2002).

Ainsi, les applications de la TG sont limitées aux réactions impliquant des changements de masse. Les changements de masse de l'échantillon, causés par les phénomènes physico-chimiques prenant place lors du chauffage de l'échantillon, sont mesurés à l'aide d'une thermobalance. Cette thermobalance est composée d'une microbalance électronique, d'un four, d'un programmeur de température, le tout contrôlé par ordinateur, ce qui permet à la fois de chauffer et de peser l'échantillon d'une manière contrôlée (figure III-19) (Karathanasis, 2008).

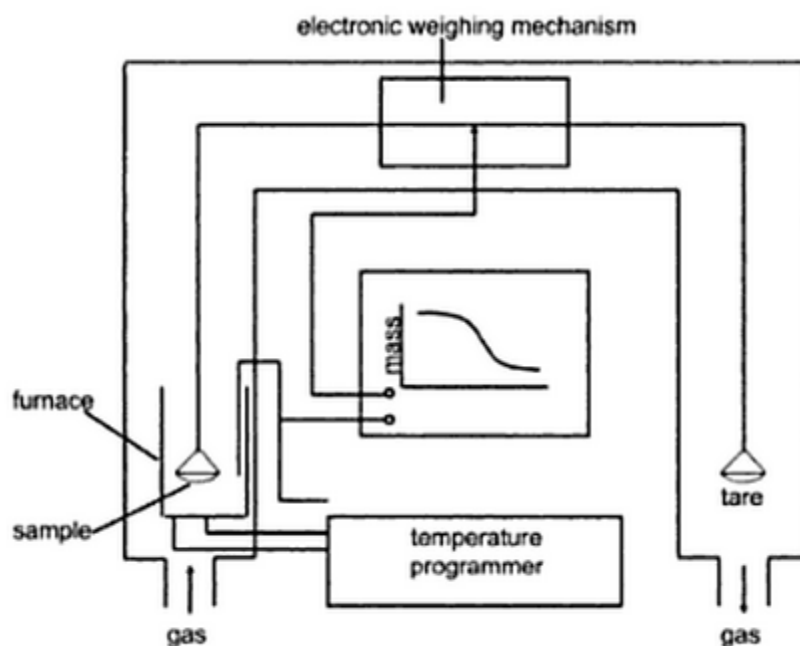


Figure III-19: représentation schématique d'un système d'analyse thermogravimétrique (dans Karathanasis, 2008).

La balance est maintenue dans un système fermé afin que l'atmosphère englobant l'échantillon et le mécanisme de pesée soient gardés sous des conditions contrôlées. La sensibilité d'une microbalance typique est de l'ordre du microgramme, et sa charge maximale est de l'ordre du gramme. Le signal de température provenant du thermocouple du four est constamment comparé et ajustée à celle du programmeur, grâce à des capteurs de flux de chaleur. Le programme de température le plus commun dans le cadre des analyses de sol est une rampe de 10 ou 20°C.min⁻¹. Des programmes de température plus complexes peuvent contenir des combinaisons de segments linéaires et isothermiques, ainsi que des taux de chauffage variables, pour maintenir un taux de changement de masse constant, afin d'obtenir une meilleure résolution (Karathanasis, 2008).

L'échantillon est généralement balayé par un gaz inerte (hélium, argon, diazote) pour éliminer les réactions d'oxydation, et minimiser les interférences causées par les gaz libérés au cours du chauffage. Les expériences réalisées sans gaz inerte (présence de dioxygène) conduisent à des températures de déshydratation et de déshydroxylation supérieures. Le balayage par gaz inerte est généralement préféré afin de diminuer la condensation des produits de réaction sur la thermobalance, et d'évacuer les produits gazeux, diminuant ainsi les réactions secondaires (Karathanasis, 2008).

La TG permet d'obtenir des informations sur des phénomènes physiques se déroulant au cours du chauffage de l'échantillon: transitions de phase du second ordre, vaporisation, sublimation, absorption, adsorption, désorption ; ainsi que sur des phénomènes chimiques : chimisorption, désolvatation (en particulier la déshydratation), décomposition, dégradation oxydative, réactions en phase solide (sauf celles se produisant sans changement de masse), réactions solide – gaz (*e.g.*, oxydation ou réduction) (Coats and Redfern, 1963).

Habituellement, les résultats d'une analyse thermogravimétrique sont présentés par :

(i) une courbe pour laquelle la masse (en absolu ou en pourcentage du poids total) est représentée en fonction du temps ou de la température (figure III-20).

(ii) une courbe pour laquelle la dérivée de la masse (dTG) est représentée en fonction du temps ou de la température, ce qui permet d'évaluer la vitesse de perte de masse au cours de l'analyse (figure III-21). Ceci permet d'observer le point d'inflexion de la courbe de TG (vitesse de perte de masse maximale), et aide à déterminer la température à laquelle la transformation débute (début du pic dTG).

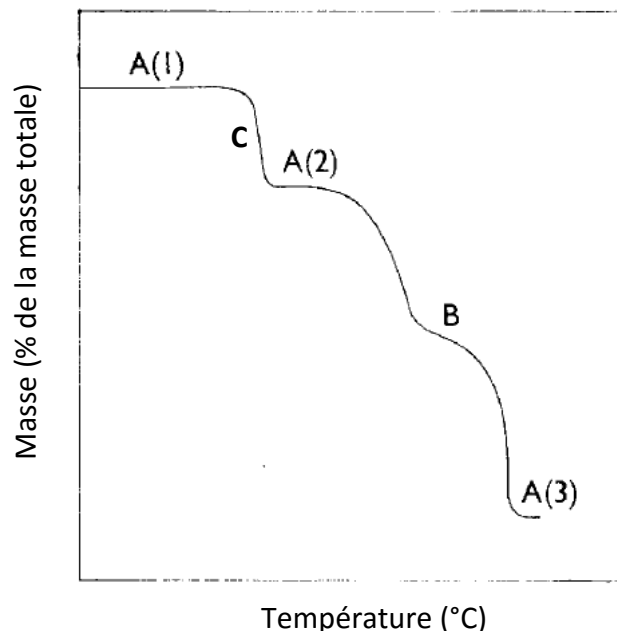


Figure III-20 : Courbe thermogravimétrique ou TG. Les sections A (1, 2 et 3) sont des plateaux sur la courbe de décomposition de l'échantillon. B correspond à un point d'inflexion (pour lequel dW/dt est à un minimum). C correspond à un autre type de point d'inflexion (pour lequel dW/dt est à un maximum) (source : Coats and Redfern, 1963).

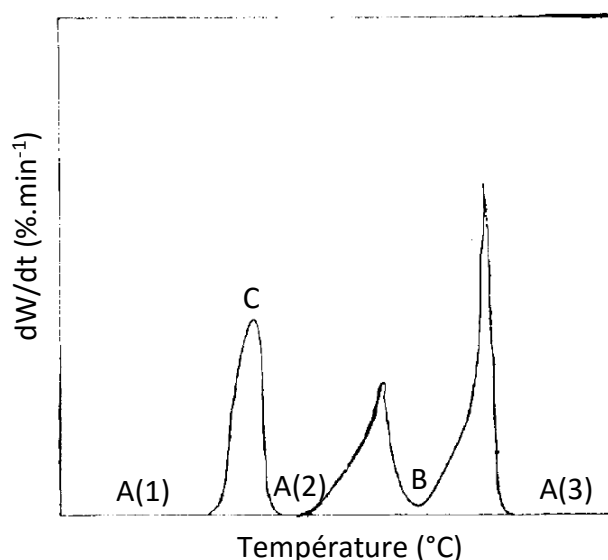


Figure III-21 : Courbe thermogravimétrique différentielle, ou dTG. Les portions A (1, 2 et 3) correspondent aux plateaux sur la courbe TG (pour lesquels $dW/dt = 0$). Le creux B correspond à un point d'inflexion sur la courbe TG (pour lequel dW/dt est à un minimum). Le pic C correspond à un autre type de point d'inflexion (pour lequel dW/dt est à un maximum) (source : Coats and Redfern, 1963).

Sur la courbe thermogravimétrique (figure III-20), plusieurs étapes peuvent être identifiées :

- (i) une portion horizontale ou plateau, indiquant une masse constante (par exemple A(1)).
- (ii) une portion incurvée, la pente de la courbe indiquant la vitesse de la perte de masse. Lorsque cette vitesse est maximale, cela correspond à une inflexion (C) avec une valeur maximum pour dW/dt .
- (iii) une inflexion (pour laquelle dW/dt est à un minimum, mais non nul) (B) peut indiquer la formation d'un composé intermédiaire.

La portion de la courbe dTG de valeur nulle ($dW/dt = 0$) (figure III-21) est équivalente à la portion horizontale de la courbe TG. Un pic sur la courbe dTG correspond à une portion incurvée de la courbe TG. Le maximum de ce pic correspond à la pente maximale sur la courbe TG. Un creux (n'atteignant pas l'axe des abscisses) sur la courbe dTG (B sur la figure III-21) correspond à une inflexion pour laquelle dW/dt est à un minimum sur la courbe TG. La hauteur du creux au-dessus de l'axe des abscisses (ligne pour laquelle $dW/dt = 0$) permet d'évaluer la

stabilité de l'intermédiaire et l'ampleur du chevauchement entre les deux réactions consécutives (correspondant aux deux pics de chaque côté du creux).

Ainsi, un pic sur la courbe dTG correspond à une étape de perte de masse. Le début d'un pic sur la courbe dTG correspond au début d'une réaction, et la fin du pic correspond à la fin de la réaction. La courbe dTG permet d'identifier le nombre d'étapes de perte de masse, et à quel moment elles se déroulent.

La courbe dTG présente certains avantages par rapport à la courbe TG. Des étapes dans la courbe TG qui ne seraient pas discernées sont plus facilement visibles dans la courbe dTG. Par exemple, un changement dans la vitesse de perte de masse peut être vu comme un creux sur la courbe dTG, indiquant deux réactions consécutives, ou bien comme une épaule sur un pic, qui indiquerait deux réactions presque simultanées, ou encore comme une traînée (« tailing ») à la fin d'un pic, indiquant probablement une forte adsorption du produit volatil sur la nouvelle phase solide (Coats and Redfern, 1963).

Un exemple de courbe thermogravimétrique (TG) et thermogravimétrique différentielle (dTG) sont présentés en figure III-22.

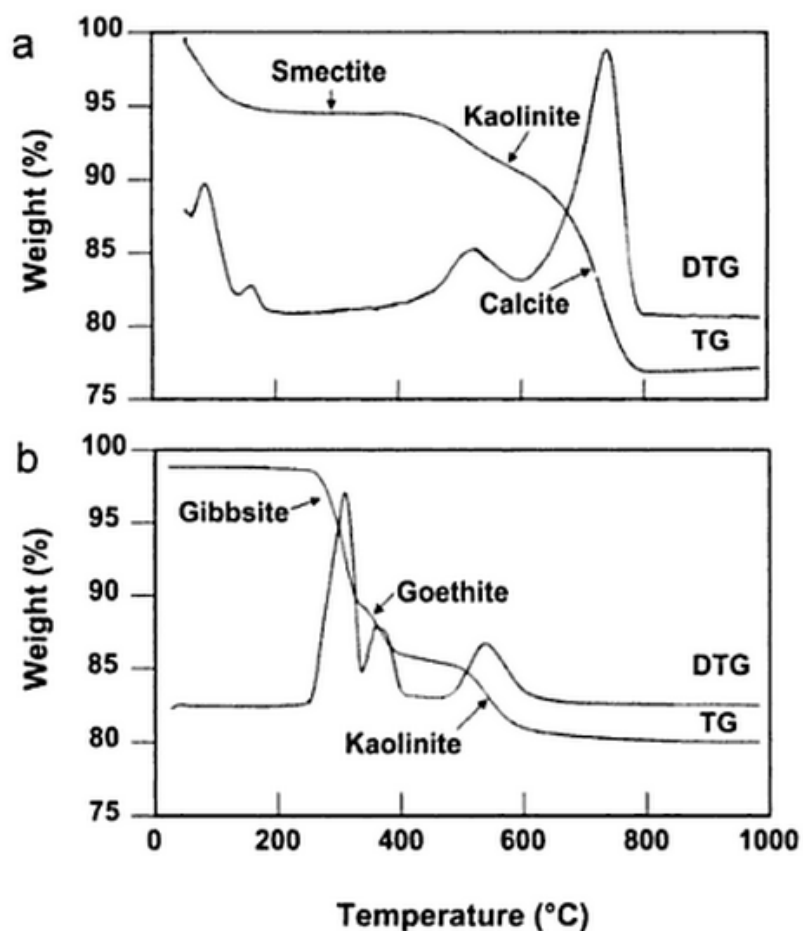


Figure III-22 : Courbes TG/dTG typiques de deux sols argileux, contenant : (a) smectite, kaolinite et calcite ; et (b) gibbsite, goethite, et kaolinite (dans Karathanasis, 2008)

Un scan TG typique d'un sol argileux, équilibré à 52 – 56% d'humidité relative (« relative humidity », RH), avec un chauffage depuis la température ambiante jusqu'à 1000°C, à 20°C.min⁻¹, sous atmosphère de N₂, produira habituellement des réactions associées seulement avec des pertes de masse (pas de gains de masse), puisque la présence de gaz inerte inhibe les réactions d'oxydation (figure III-22) (Karathanasis, 2008).

La présence de smectite (ou de minéraux du groupe allophane) en quantité suffisante (> 20%) est associée à une inflexion initiale, correspondant à une déshydratation d'eau adsorbée, débutant au début du programme de température et se terminant à environ 250°C. Les dernières étapes (150 – 250°C) de cette réaction de déshydratation peuvent inclure la perte d'eau liée par coordination aux cations saturants (c'est-à-dire l'eau inter-feuillets), ou d'eau associée à la surface des smectites (c'est-à-dire l'eau de solvation). La quantité d'eau perdue dépend du type de cation saturant.

Habituellement, dans cette gamme de température, dans des échantillons contenant principalement d'autres phyllosilicates TOT (ou 2:1), ou des minéraux du groupe de la kaolinite (TO, ou 1:1) (pour la nomenclature, cf. paragraphe 1.3.6.3.b) au chapitre I), beaucoup de pertes associées à l'eau adsorbée sont considérablement inférieures à 5%. Un chevauchement significatif d'évènements de perte de masse peut se dérouler dans cette gamme de température, pour des échantillons contenant de l'halloysite hydratée, de l'allophane, du gypse, ou de la gibbsite. L'halloysite hydratée et l'allophane perdent leur eau sorbée à 100 – 200°C, le gypse à 140-200°C, et la gibbsite se déshydroxyle à 220 – 300°C. Ainsi, toutes ces réactions peuvent théoriquement être confondues avec la déshydratation des minéraux de type smectite. Puisque la coexistence de smectite et de gibbsite dans des échantillons naturels est inhabituelle, les échantillons posant problème sont ceux contenant de la smectite, de l'halloysite hydratée, de l'allophane, et du gypse (Karathanasis, 2008).

Dans les échantillons contenant des hydroxydes de fer ou des oxyhydroxydes de fer (goethite), l'étape suivante de perte de masse est associée à la déshydroxylation de ces minéraux, et se déroule entre 250 et 350°C, réaction coïncidant habituellement avec la déshydroxylation de la gibbsite. Dans la gamme de température 350 – 500°C, la déshydroxylation de certains hydroxysulfates de fer ou d'aluminium, et des minéraux palygorskite ou sépiolite, peut interférer avec les étapes initiales de la déshydroxylation de la kaolinite. Lorsque des minéraux en couches, possédant des polymères d'hydroxydes d'aluminium entre leurs couches (« Al-hydroxy-interlayered minerals »), coexistent avec la kaolinite, une déshydroxylation graduelle de la phase inter-couche peut masquer l'inflexion initiale de la réaction de déshydroxylation de la kaolinite (Karathanasis, 2008).

La gamme de températures 450 – 600°C est typique des pertes de masse associées à la déshydroxylation des minéraux du groupe kaolinite. Dans les échantillons contenant des chlorites riches en fer et des smectites trioctaédriques (saponite, hectorite), le point d'inflexion final de la déshydroxylation de la kaolinite peut interférer avec les étapes précoces des réactions de déshydroxylation de ces derniers (450 – 600°C) (Karathanasis, 2008) (cf. paragraphe 1.3.6.3.b. au chapitre I pour une définition du terme « trioctaédrique »).

La majorité des minéraux TOT (ou 2 :1) (smectites, vermiculites, illites) et TOT:O (ou 2:1:1, ou 2:2) (chlorites, « Al-hydroxy-interlayered minerals »), ainsi que certains minéraux du groupe de la serpentine, subissent une déshydroxylation au sein de la gamme de températures 600 – 750°C. Les températures de déshydroxylation initiales et finales peuvent

varier légèrement, dépendant de la variation structurale et compositionnelle des minéraux (par exemple, les chlorites riches en fer, et les smectites trioctaédriques, ont des températures de déshydroxylation plus faibles). Bien que la plupart des carbonates subissent des pertes de masse de décomposition au-dessus de 700°C, la sidérite et la magnésite peuvent subir une décarbonatation à des températures plus faibles (600 – 700°C), entraînant une perte de masse pouvant se confondre avec celles entraînées par les réactions de déshydroxylation des minéraux 2:1 et « hydroxy-interlayered ». Finalement, la gamme de température 700 – 950°C est caractérisée par des pertes de masse associées avec la décarbonatation d'autres carbonates. La dolomite se décompose habituellement de 700 à 800°C, la calcite de 800 à 900°C, et l'aragonite de 850 à 950°C. La température de décarbonatation est fortement dépendante de la composition cationique et de l'ordre structurel (Karathanasis, 2008).

Une liste plus extensive des réactions subies par les différents minéraux se déroulant au cours du chauffage d'un échantillon de sol est présentée dans le tableau III-4. La connaissance de ces données permet l'identification des minéraux présents.

Mineral	Temperature region °C	Type of reaction
Oxides/hydroxides		
Gibbsite	250–350	-OH → H ₂ O
Goethite	300–400	-OH → H ₂ O
Carbonates/sulfates/ sulfides/phosphates		
Calcite	750–900	-CO ₃ → CO ₂
Dolomite	500–950	-CO ₃ → CO ₂
Magnesite	500–750	-CO ₃ → CO ₂
Siderite	450–600	-CO ₃ → CO ₂
Na ₂ CO ₃	500–1000	-CO ₃ → CO ₂
Gypsum	100–350	H-OH → H ₂ O
Alunite	450–560	-OH → H ₂ O
Jarosite	250–460	-OH → H ₂ O
Pyrite	400–550	-S → SO ₂
Strengite	200–400	-OH → H ₂ O
1:1 Layer silicates		
Kaolinite	400–600	-OH → H ₂ O
Halloysite	400–600	-OH → H ₂ O
Endellite	400–600	-OH → H ₂ O
Antigorite	600–900	-OH → H ₂ O
2:1 Layer silicates		
Mg-smectite (52% RH)	25–250	H-OH → H ₂ O
	600–900	-OH → H ₂ O
Mg-vermiculite (52% RH)	220–250	H-OH → H ₂ O
Hectorite	500–900	-OH → H ₂ O
Mica	500–900	-OH → H ₂ O
Talc	850–1050	-OH → H ₂ O
2:2 Layer silicates		
Chlorite	540–800	-OH → H ₂ O

Tableau III-4: gammes de températures et types de réactions correspondant aux pertes de masse observées pour différents minéraux, lors d'une analyse thermogravimétrique (dans Karathanasis, 2008).

Calorimétrie différentielle à balayage

Définition de la DSC

Selon l'IUPAC, la calorimétrie différentielle à balayage (« differential scanning calorimetry », DSC) est une technique par laquelle la différence entre l'énergie apportée à une substance, et celle apportée à une référence, est mesurée en fonction de la température, lors

du chauffage de la substance et de la référence via un programme de température contrôlé. Plus précisément, la DSC consiste à mesurer la différence de flux de chaleur (énergie), en fonction de la température ou du temps, entre un échantillon et un matériau de référence, lorsqu'ils sont soumis à un programme de température contrôlé (Karathanasis, 2008). Autrement dit, elle est la mesure de la variation d'une propriété : la différence entre le taux de flux de chaleur apporté à un échantillon, et celui apporté à une référence, lors de leur chauffage via un programme de température contrôlé (Höhne *et al.*, 2003). La référence est une substance contenue dans une nacelle (l'échantillon à analyser étant contenu dans une autre nacelle).

Principe de la DSC

Les réactions chimiques, ainsi que beaucoup de transitions physiques, sont liées à la production ou la consommation de chaleur. Ainsi, la calorimétrie est une méthode de choix pour investiguer de tels processus. Les calorimètres sont des appareils qui permettent d'appliquer ou de soustraire à un échantillon une quantité connue de chaleur et de mesurer les changements de température dudit échantillon (Höhne *et al.*, 2003).

La variation de la propriété mesurée par la DSC (la différence dans le taux de flux de chaleur) est normalement causée par une altération de la température de l'échantillon. Ceci implique l'utilisation d'un programme de température contrôlé. Dans le cas de réactions/transitions activées par la température (par exemple par le changement contrôlé d'une valeur de température constante à une autre), la température de l'échantillon est altérée par des processus internes, et est à l'origine du signal DSC (Höhne *et al.*, 2003).

La chaleur fluctue seulement si une différence de température est présente. Autrement dit, une différence non nulle dans le taux de flux de chaleur implique toujours une différence de température entre l'échantillon et la référence et leur environnement. Un changement dans la différence du taux de flux de chaleur implique également un changement de température (Höhne *et al.*, 2003).

Instrumentation et fonctionnement

Les instruments DSC peuvent fournir des déterminations calorimétriques précises de chaleurs de réaction ou de changements d'enthalpie (ΔH) associés à différents événements thermiques. Il existe deux grands types d'instruments DSC, basés sur des principes de fonctionnement différents : (i) la DSC à flux de chaleur (figure III-23), et (ii) la DSC à compensation de puissance (Karathanasis, 2008). L'instrument utilisé dans notre cas est de type DSC à flux de chaleur.

Dans le cas de la DSC à flux de chaleur, l'échantillon et le matériau de référence sont chauffés depuis la même source, et la différence de température (ΔT) est mesurée et convertie en différence d'énergie par une fonction de sensibilité calorimétrique (Karathanasis, 2008).

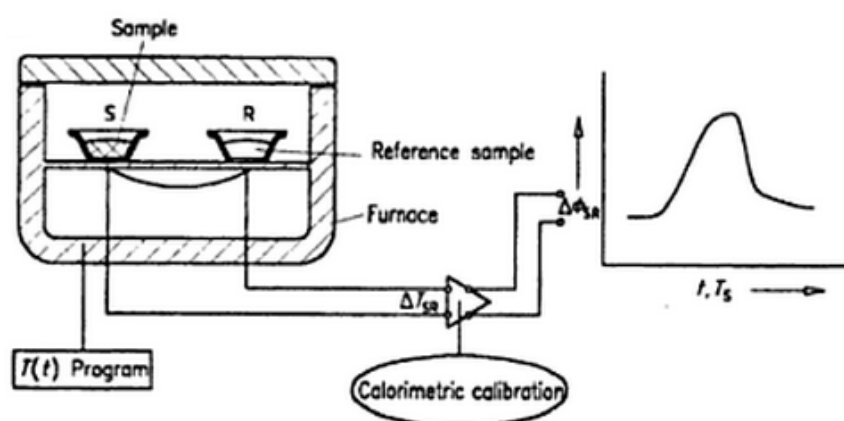


Figure III-23 : représentation schématique d'un système d'analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), de type flux de chaleur (dans Karathanasis, 2008). S : échantillon ; R : référence ; ΔT_{SR} : différence de température entre l'échantillon et la référence ; $\Delta \phi_{SR}$: différence de flux de chaleur entre l'échantillon et la référence.

Les événements thermiques se déroulant dans l'échantillon apparaissent en tant que déviations sur la ligne de base, que ce soit dans le sens endothermique ou exothermique, selon si plus ou moins d'énergie doit être fournie à l'échantillon, relativement au matériau de référence. En DSC, les réponses endothermiques sont représentées par un déplacement positif (au-dessus de la ligne de base), correspondant à un transfert d'énergie accru vers l'échantillon, comparé au matériau de référence.

Des thermocouples sont utilisés en tant que capteurs pour l'échantillon et la référence. Pour beaucoup d'instruments DSC, les parois du four sont en argent et chauffés par une résistance. La haute conductivité thermique de l'argent assure une température uniforme au

sein du four. La nécessité d'un microprocesseur rapide est primordiale en DSC, puisque le signal ΔT doit être converti en un signal de différence d'énergie (grâce à la fonction de sensibilité calorimétrique) avant que le flux de chaleur (q) puisse être enregistré. Ainsi, la sensibilité de l'instrument calorimétrique est améliorée avec des échantillons de masse faible (10 à 100 mg), puisque cela maintient les gradients de température à un minimum (Karathanasis, 2008).

La plupart des expériences minéralogiques sont conduites sous atmosphère inerte (balayement du four par un gaz inerte, tel que l'hélium ou l'argon). Ceci permet d'évacuer les produits gazeux et empêcher la corrosion du four et des capteurs thermiques des substances réactives. De plus, cela permet d'éviter l'oxydation des constituants organiques potentiellement présents dans le sol. Ceci permet une meilleure identification des minéraux subissant une déshydratation ou une déshydroxylation dans la même gamme de température que celle des réactions exothermiques provenant de l'oxydation des constituants organiques. L'atmosphère inerte permet aussi d'éliminer les réactions exothermiques associées avec l'oxydation des hydroxydes de fer ou des hydroxyoxydes de fer, à la suite de leur déshydroxylation, qui peuvent limiter la lecture des mesures de masse ou de flux de chaleur (Karathanasis, 2008).

Combinaison avec la TG

La combinaison de la TG avec la DSC permet de directement lier les flux de chaleur endothermiques ou exothermiques aux changements de masse. Puisque les deux mesures sont faites sur le même échantillon, une haute précision d'échange de chaleur par unité de masse peut être obtenue pour des réactions chimiques pour lesquelles l'effet énergétique a causé le changement de masse (Karathanasis, 2008).

La figure III-24 présente un exemple de courbe typique obtenue par DSC, suite à l'analyse des sols présentés en figure III-22 (courbes TG/dTG).

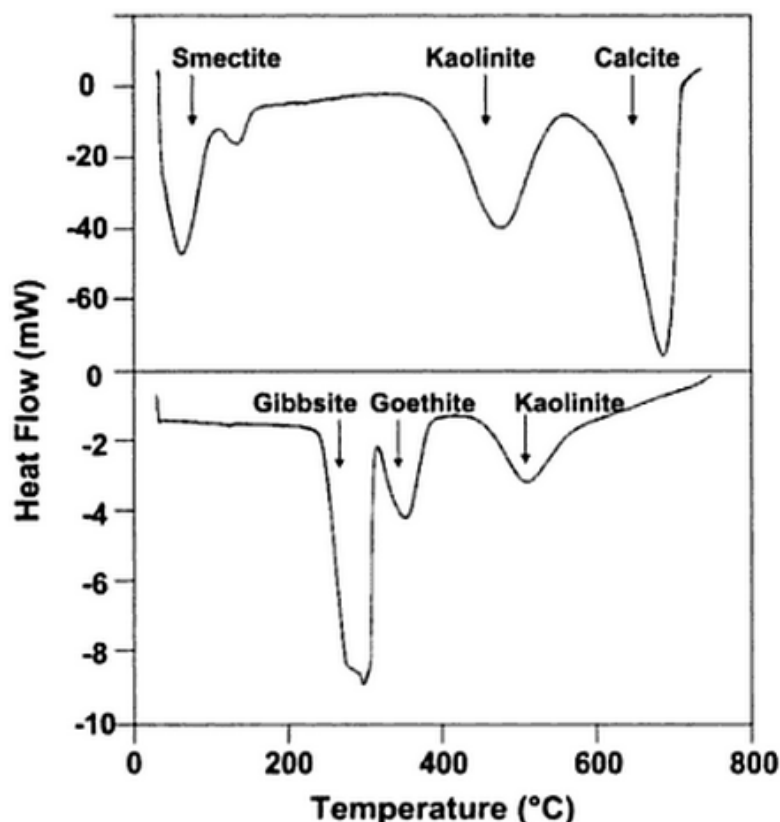


Figure III-24: courbes obtenues par calorimétrie différentielle à balayage sur les deux sols de la figure III-22 (dans Karathanasis, 2008).

L'avantage des courbes DSC n'est pas seulement de pouvoir mettre en évidence les pics endothermiques et exothermiques associés avec les réactions de déshydratation, déshydroxylation, décomposition et oxydation, mais aussi de montrer les pics endothermiques et exothermiques causés par des réactions de transformation des minéraux, ou des transitions de phase, non nécessairement associées à des pertes ou gains de masse, et ainsi, non détectées par l'analyse TG (figure III-24). Ainsi, les courbes DSC peuvent fournir des informations supplémentaires sur l'identité des minéraux présents, améliorant la qualité du diagnostic des données thermo-analytiques (Karathanasis, 2008).

Par exemple, un pic endothermique abrupt à 573°C sur une courbe DSC est associé à une inversion $\alpha \rightarrow \beta$ réversible du quartz. Des pics exothermiques entre 450 et 550°C correspondent à une transition des polymorphes $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ vers $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ vers $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Des pic exothermiques dans la gamme 900 – 1000°C seront associés à la recristallisation de phases minérales dioctaédriques déshydroxylées telles que la kaolinite, montmorillonite ou illite, vers des minéraux de type spinel (MgAl_2O_4) ; et vers la mullite ($\text{Al}_6\text{Si}_2\text{O}_{13}$) et le corindon

(α -Al₂O₃) dans la gamme 1000 – 1200°C (*cf.* paragraphe 1.3.6.3.b. au chapitre I pour une définition des termes « dioctaédrique » et « trioctaédrique »). La présence de minéraux trioctaédriques, tels que la serpentine, le talc, la saponite, la vermiculite et la chlorite entraînent l'observation de pics exothermiques dans la gamme 700 – 1100°C, associés à la formation des phases minérales fostérite (Mg₂SiO₄) ou enstatite (MgSiO₃).

Le couplage de l'analyse thermique et de l'EGA fournit quant à elle de grands avantages pour le diagnostic des gaz libérés au cours de chaque réaction thermique, la détection des phases minérales présentes, et le type de transition thermique impliqué (Karathanasis, 2008).

Spectrométrie de masse

La décomposition thermique et l'évaporation d'espèces sont mesurées par la TG et la DSC, mais ces techniques ne fournissent pas d'informations quant à la composition des espèces formées ou relâchées. Le couplage de la TG à un spectromètre de masse permet alors d'identifier ces espèces.

La combinaison de la TG avec l'EGA (en l'occurrence, la SM) permet la mesure simultanée des changements de masse en fonction de la température, et une caractérisation des produits formés en conséquence de la désorption ou décomposition lors du chauffage de l'échantillon. Le gaz de balayage de l'instrument d'analyse thermique devient le vecteur des gaz libérés. Les gaz libérés pénètrent la chambre d'ionisation et sont bombardés par des électrons et sont fragmentés en ions positifs. Ces ions sont séparés par le quadrupôle en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (grandeur exprimée ici en u, pour « unité de masse atomique unifiée »). Un logiciel produit des scans de l'intensité du courant d'ion à chaque rapport m/z , en fonction de la température ou du temps. Bien que la fragmentation de certaines molécules parentes se déroulant dans des SM avec un faible potentiel d'ionisation puisse compliquer l'identification des gaz, la technique est considérée comme étant extrêmement sensible (Karathanasis, 2008).

Ici, nous avons tout d'abord réalisé pour chaque échantillon (Atacama, Svalbard, Rio Tinto) une analyse TG-DSC-MS. La masse et le signal DSC sont mesurés en fonction de la température. Simultanément, les différentes molécules libérées sont transférées vers le MS,

où, après fragmentation, l'intensité de leurs ions (proportionnelle à leur concentration) est mesurée. Cela nous permet dans un premier temps, sur un graphique en trois dimensions, de présenter les intensités des ions en fonction de la température et de leur rapport m/z . Ainsi, nous pouvons observer la libération de différentes espèces du sol en fonction de la température. Ensuite, ces résultats sont mis en relation ces données avec les données acquises grâce à la TG et la DSC.

Dans le cas de Rio Tinto, nous avons réalisé une analyse supplémentaire, dans laquelle nous avons utilisé le spectromètre de masse en mode « Multiple Ion Detection » (MID) : plutôt que de mesurer l'intensité d'une gamme entière de rapports m/z , seuls certains ions sont choisis, et mesurés individuellement au cours du gradient de température. Ce type d'analyse permet d'avoir une fréquence d'acquisition plus rapide, ce qui la rend plus sensible, et permet d'obtenir des courbes d'intensité de ces ions tout au long de l'analyse, afin de pouvoir déterminer les espèces qui sont relâchées au cours du chauffage.

Dans le cadre de nos analyses TG-DSC-MS, nous avons soumis nos échantillons à une rampe de 10°C par minute, sous atmosphère d'hélium (ou d'argon pour Rio Tinto). De l'alumine l' Al_2O_3 est utilisée en tant que matériau de référence. L'appareil utilisé est de la marque Setaram (TG92). Le logiciel utilisé pour le traitement des données est Calisto.

Le spectromètre de masse utilisé ici, de type quadrupolaire, est différent de celui utilisé pour les analyses par CPG-SM. C'est un Omnistar 300 de la marque Pfeiffer Vacuum. La source d'ions est de type HS Yttria. L'énergie d'impact électronique est de 70 eV. Le logiciel employé pour le traitement des données est Quadstar 32 bit.

3.4.2.3) Résultats et discussion

3.4.2.3.1) Atacama

Le premier échantillon analysé par TG-DSC-MS est un échantillon du sol d'Atacama, sol analogue reconnu pour sa nature oxydante (susceptible de contenir des perchlorates à une concentration maximale de 0,6 %wt, ou d'autres oxydants, cf. paragraphe 1.5.2.3.a) au chapitre I), de masse 72,81 mg. Le matériau de référence est Al_2O_3 , de masse 66,893 mg. Le gaz inerte est de l'hélium. Le programme de température est constitué d'une rampe de 10°C.min⁻¹, avec une température initiale de 20°C, jusqu'à 1000°C.

Etude de l'évolution de l'intensité des fragments détectés, en fonction du gradient de température

La figure III-25 est la représentation en trois dimensions des résultats de cette analyse, montrant l'intensité (courant d'ion) en fonction du rapport m/z et de la température. Le logiciel de traitement de données (Quadstar 32 bit) étant fortement limité (nécessité d'exporter les centaines de cycles un par un), nous avons extrait les données à partir des fichiers de données bruts (*.sac) vers Matlab, grâce à un code développé par Moritz Bubek et mis à jour par Zaccaria Silvestri (Silvestri, 2013).

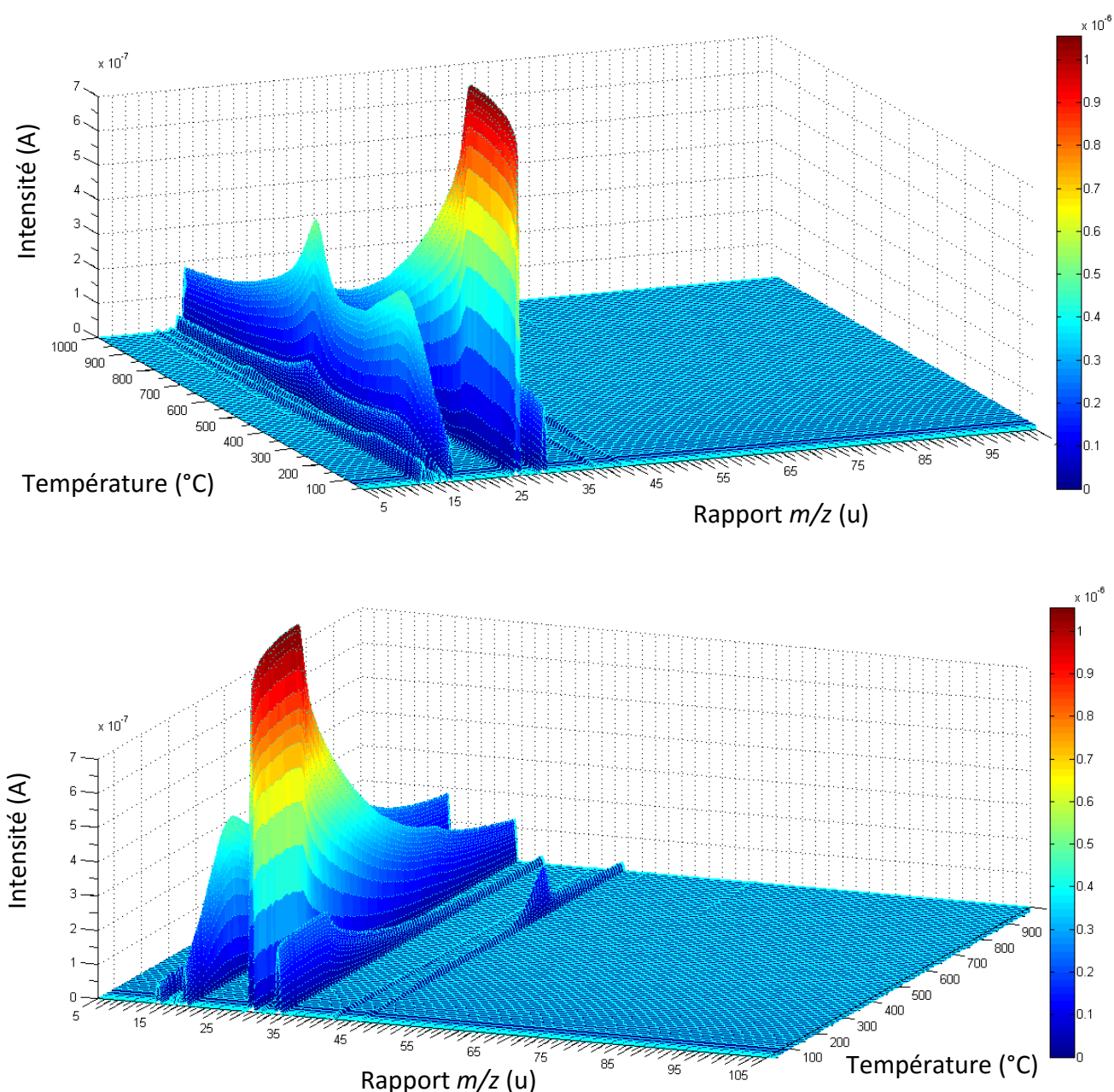


Figure III-25: Représentations graphiques (montrant la même figure sous deux angles différents) d'une analyse TG-DSC-MS sur un échantillon de sol d'Atacama. Chauffage à 10°C/min, sous atmosphère d'hélium

Sur la figure III-26, permettant une lecture plus aisée de l'axe des abscisses et des ordonnées, on voit que les rapports m/z moyens les plus abondants au cours du gradient de température sont les suivants : 12, 14, 16, 17, 18, 28, 29, 32, 40, 44 et 64 u, avec des intensités maximales de $7,42 \cdot 10^{-9}$, $6,97 \cdot 10^{-8}$, $3,37 \cdot 10^{-8}$, $1,3 \cdot 10^{-7}$, $5,37 \cdot 10^{-7}$, $1,06 \cdot 10^{-6}$, $8,98 \cdot 10^{-9}$, $2,23 \cdot 10^{-7}$,

$1,11 \cdot 10^{-8}$, $1,47 \cdot 10^{-7}$, et $2,9 \cdot 10^{-9}$ A, respectivement. Ces données, ainsi que les ions pouvant correspondre à ces rapports m/z , sont présentés dans le tableau III-5.

Rapport m/z	Intensité maximale (A)	Intensité maximale relative	Ions correspondants
12	7,42E-09	0,7	C^+
14	6,97E-08	6,6	N^+
16	3,37E-08	3,2	O^+
17	1,30E-07	12,3	OH^+
18	5,37E-07	50,7	H_2O^+
28	1,06E-06	100	$^{12}C^{16}O^+$ $^{14}N_2^+$
29	8,98E-09	0,8	$^{13}C^{16}O^+$ $^{14}N^{15}N^+$
32	2,23E-07	21	O_2^+ S^+
40	1,11E-08	1	Ar^+
44	1,47E-07	13,9	CO_2^+
64	2,90E-09	0,3	SO_2^+

Tableau III-5 : récapitulatif des rapports m/z observés au cours de cette analyse, intensité maximale absolue et relative, et ions pouvant correspondre aux rapports m/z observés

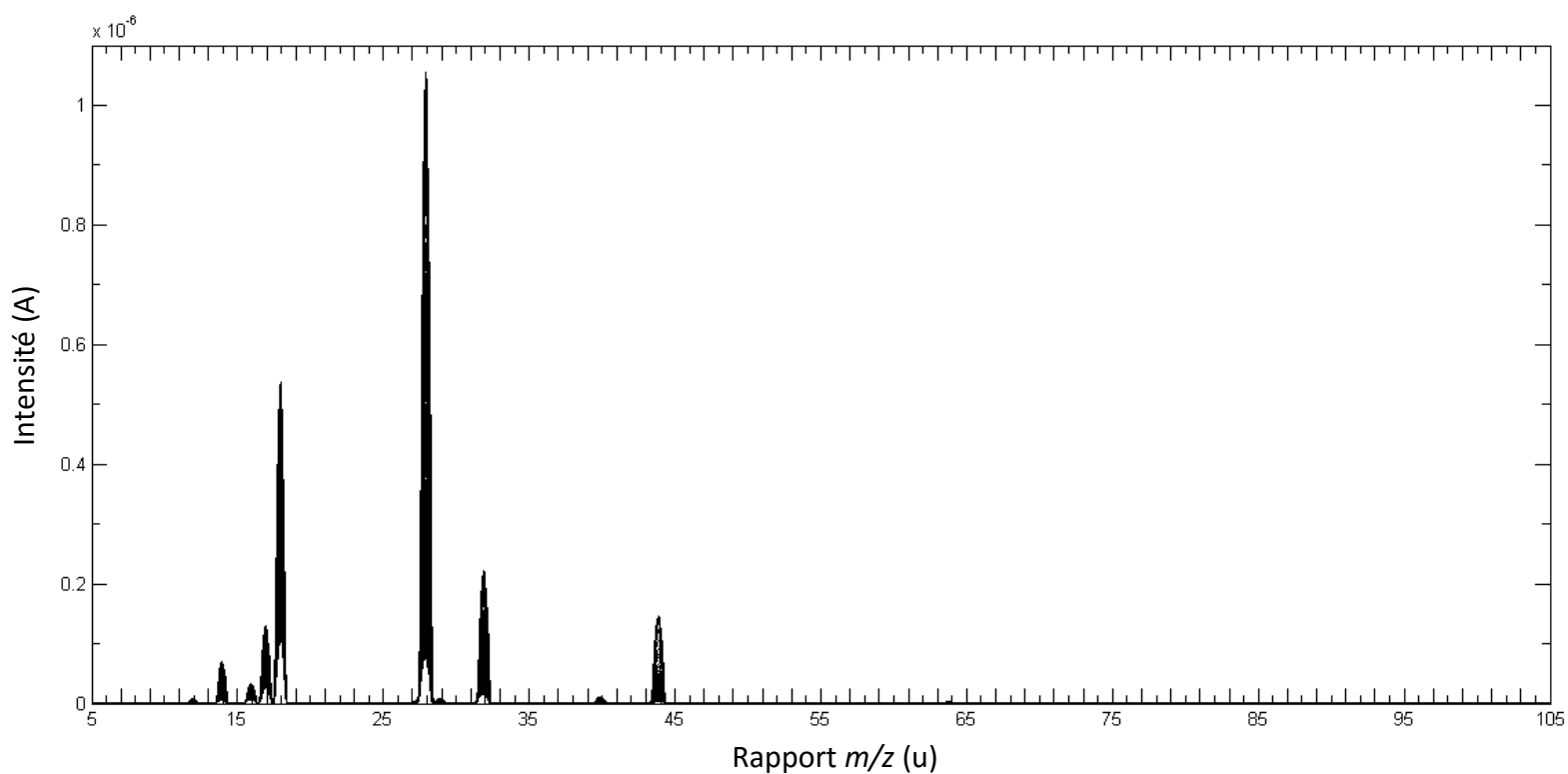


Figure III-26: Représentation graphique du courant d'ions (A) en fonction du rapport m/z . L'ensemble des valeurs d'intensité mesurées au cours du gradient de température est présent.

Nous allons maintenant représenter l'évolution de l'intensité de ces rapports m/z en fonction du gradient de température (figure III-27).

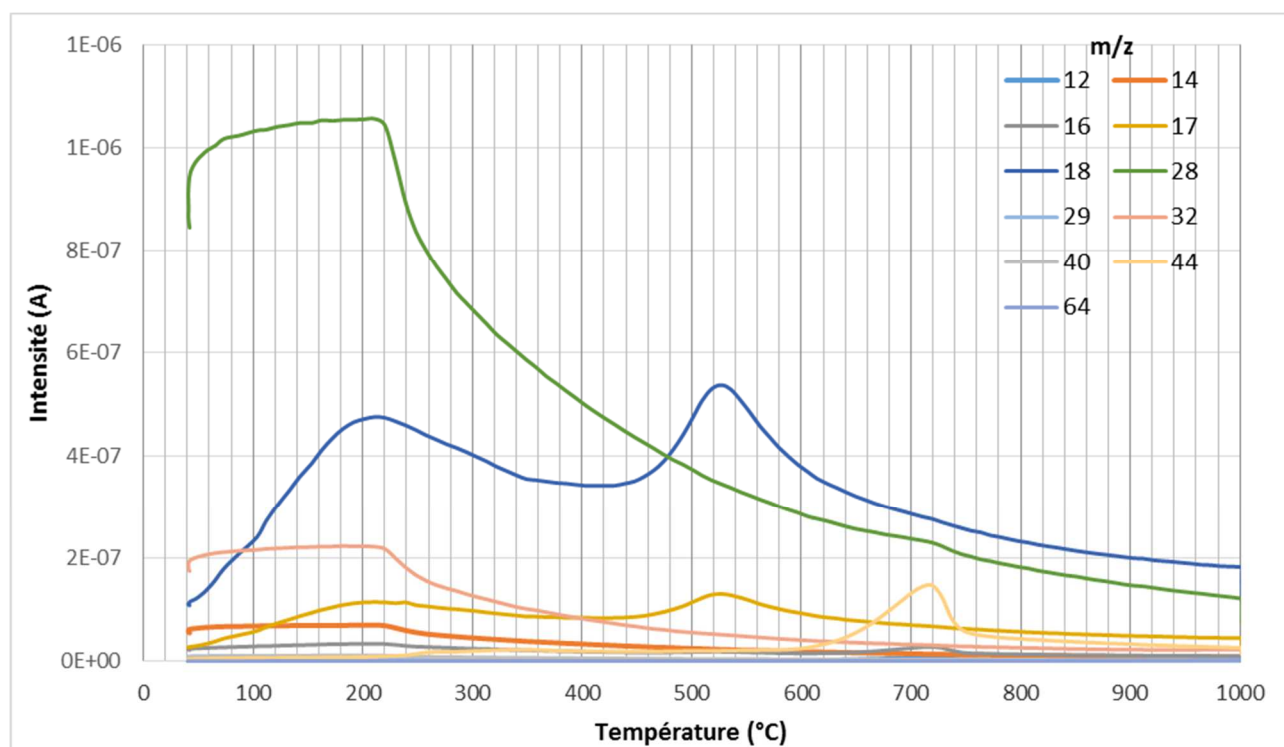
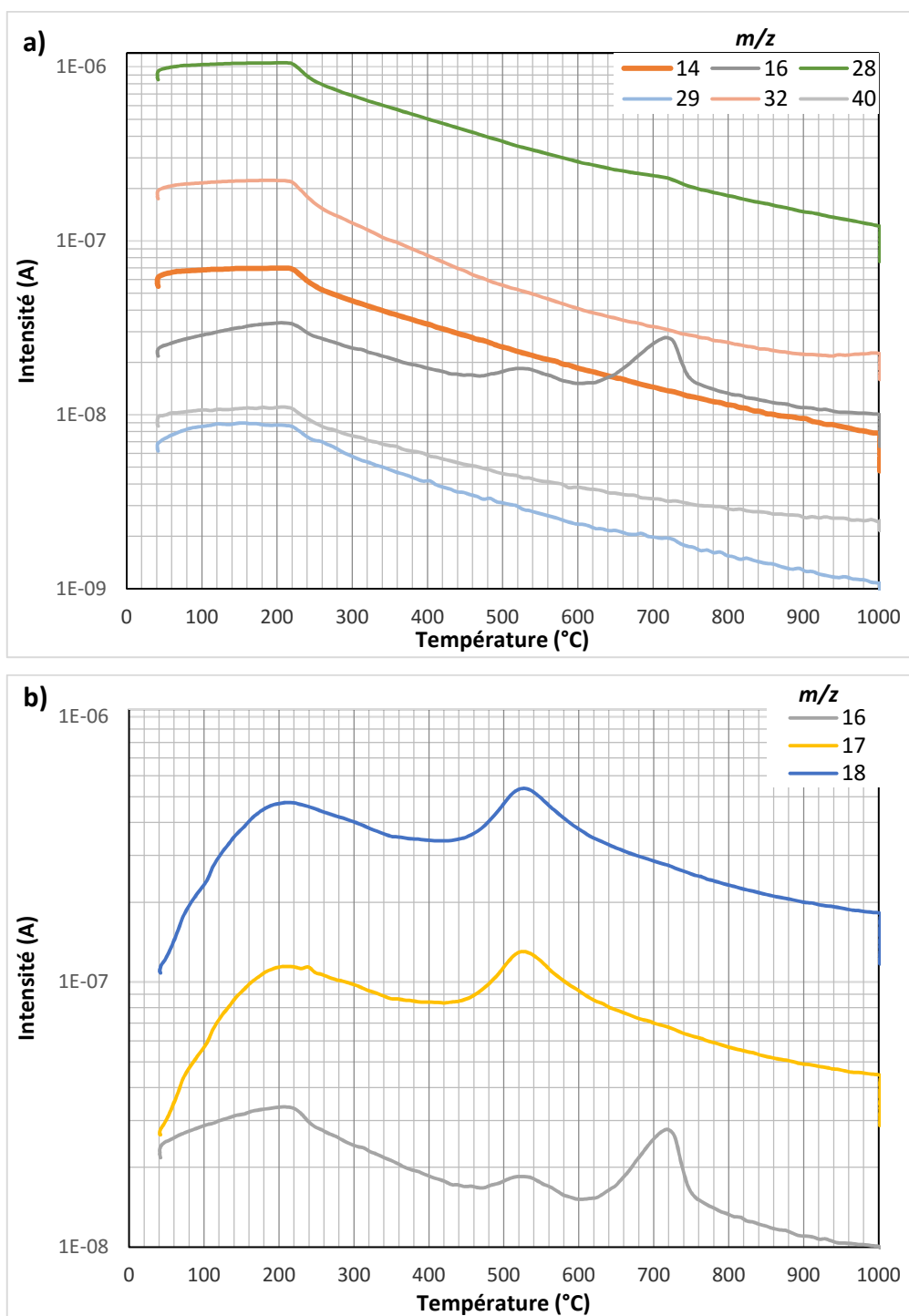


Figure III-27 : Intensité (A) en fonction de la température (°C) lors du chauffage de l'échantillon de sol d'Atacama

On peut voir sur cette figure que la libération de gaz à partir de l'échantillon se déroule en trois étapes principales: une première étape dont l'intensité maximale est atteinte à 211°C, suivie par une deuxième étape avec une intensité maximale à 527°C, et enfin une dernière étape avec une intensité maximale à 720°C. La lecture de cette figure étant limitée, nous pouvons observer de manière plus détaillée la libération des différents gaz grâce à la représentation des intensités sur une échelle logarithmique de base 10 (figure III-28). Les différentes courbes ont été réparties sur trois graphiques en fonction de la similarité de leurs profils d'évolution de l'intensité en fonction de la température.



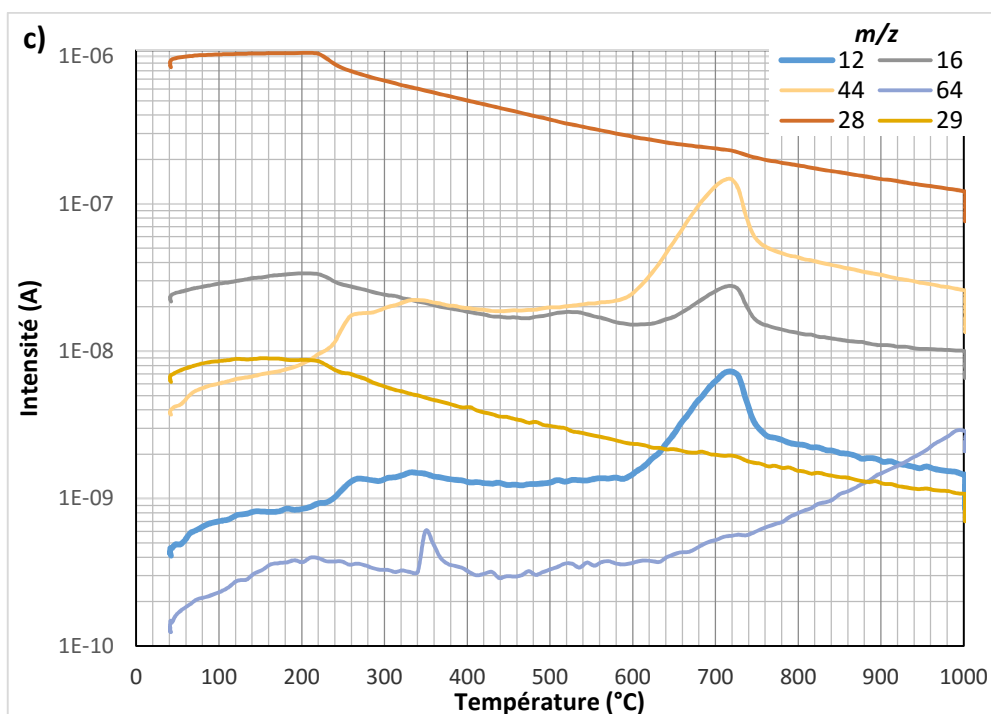


Figure III-28 : Représentation graphique de l'intensité (A) (échelle logarithmique) en fonction de la température (°C)

Grâce à la figure III-28, nous pouvons observer plusieurs types de courbes :

- celles possédant un plateau dès le début de l'analyse, jusqu'à 211°C, avant de décroître (m/z 32, 14, 40) (figure III-28.a) ;
- celles possédant deux pics d'intensité, un à 211°C et un à 527°C (m/z 17, 18) (figure III-28.b) ;
- celles possédant un pic d'intensité à 720°C, plus deux autres pics plus faibles à 340°C et 276°C (m/z 44, 12) (le rapport m/z = 29 semble posséder des pics d'intensité à ces mêmes températures, excepté 340°C) (figure III-28.c) ;
- les courbes « mixtes » : les rapports m/z 28 et 29 sont du premier type, mais montrent un faible pic à 720°C (caractéristique du deuxième type); et le rapport m/z 16 montre les caractéristiques des trois premiers types ;
- et enfin le rapport m/z 64, au comportement singulier, qui possède un pic à 350°C, et décroît avant d'augmenter de nouveau jusqu'à la fin de l'analyse.

L'espèce de rapport m/z 16 est libérée en trois étapes au cours du chauffage, et pourrait provenir d'une espèce différente à chaque étape.

Nous disposons maintenant d'une vision plus précise des trois étapes principales de la libération de gaz au cours du chauffage :

- la première étape, voyant la libération simultanée de ce qui semble être deux espèces différentes jusqu'à 211°C: celle de type 1 (figure III-28.a)) et celle de type 2 (figure III-28.b)).
- la deuxième étape : libération de l'espèce de type 2 (rapports m/z 16, 17 et 18) avec un pic d'intensité maximale à 527°C.
- la troisième étape : libération de ce qui semble être une troisième espèce (caractérisée par les rapports m/z 12,16 et 44; 28 et 29) avec un pic d'intensité maximale à 720°C.

Nous allons maintenant procéder à l'identification de ces différentes espèces, en comparant les spectres de masse typiques (source : NIST web book) des principaux gaz attendus lors du chauffage d'un échantillon de sol (dioxygène O_2 , dioxyde de carbone CO_2 , eau H_2O , dioxyde de soufre SO_2) avec les intensités relatives des différents rapports m/z mesurés au cours de l'analyse.

Dioxygène:

Les rapports $m/z = 16$ et $m/z = 32$ représentés sur le spectre de masse NIST (figure III-29.b)) correspondent aux ions O^+ et O_2^+ , respectivement (O^+ étant un fragment de l'ion moléculaire O_2^+).

On peut donc voir ici de l' O_2 qui est libéré lors de la première étape de l'analyse (figure III-29.a)). Cependant, les deux pics suivants (527°C et 720°C) pour m/z 16 ne correspondent pas à une augmentation concomitante de m/z 32, ce qui indique une contribution d'une autre source.

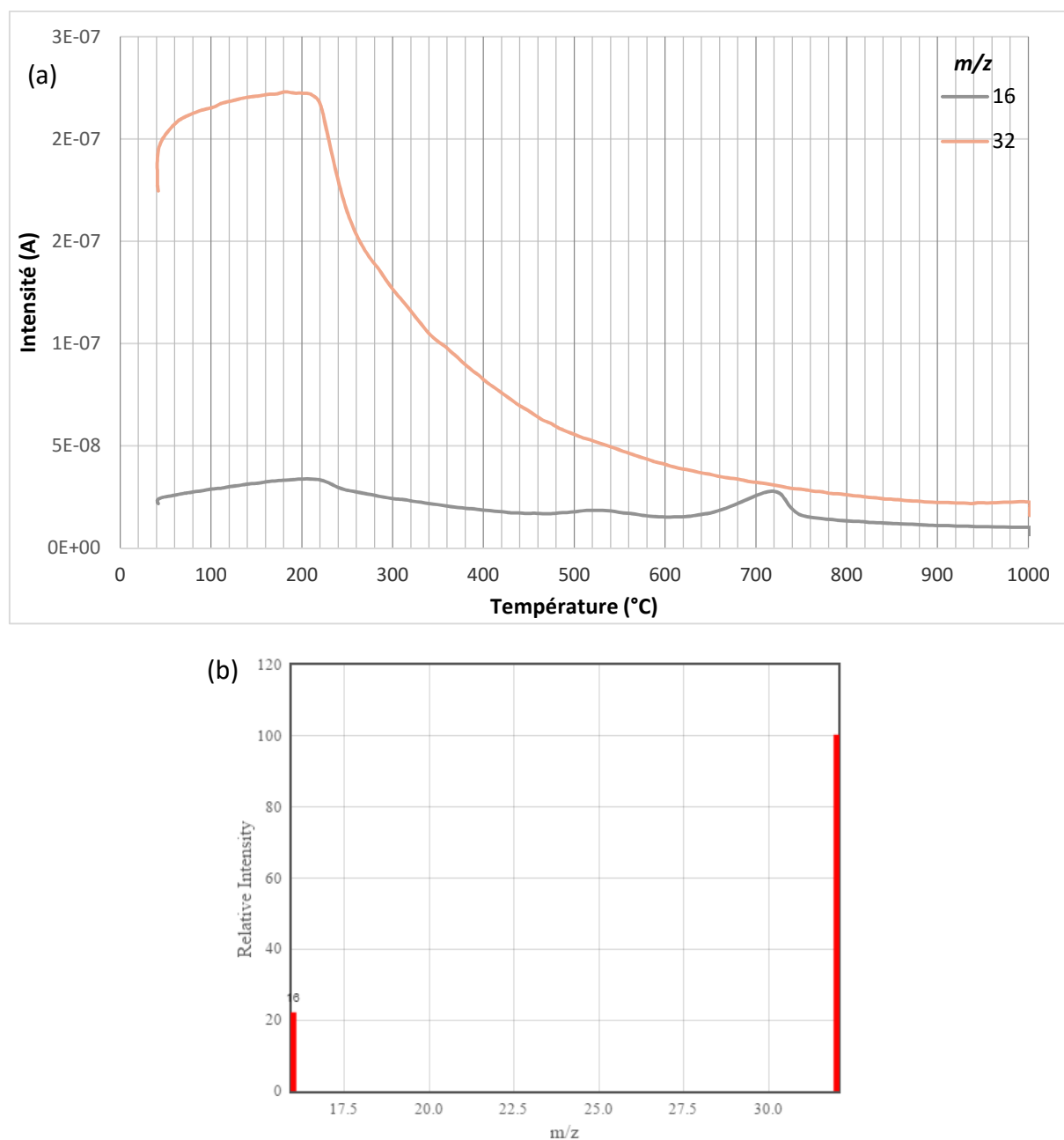
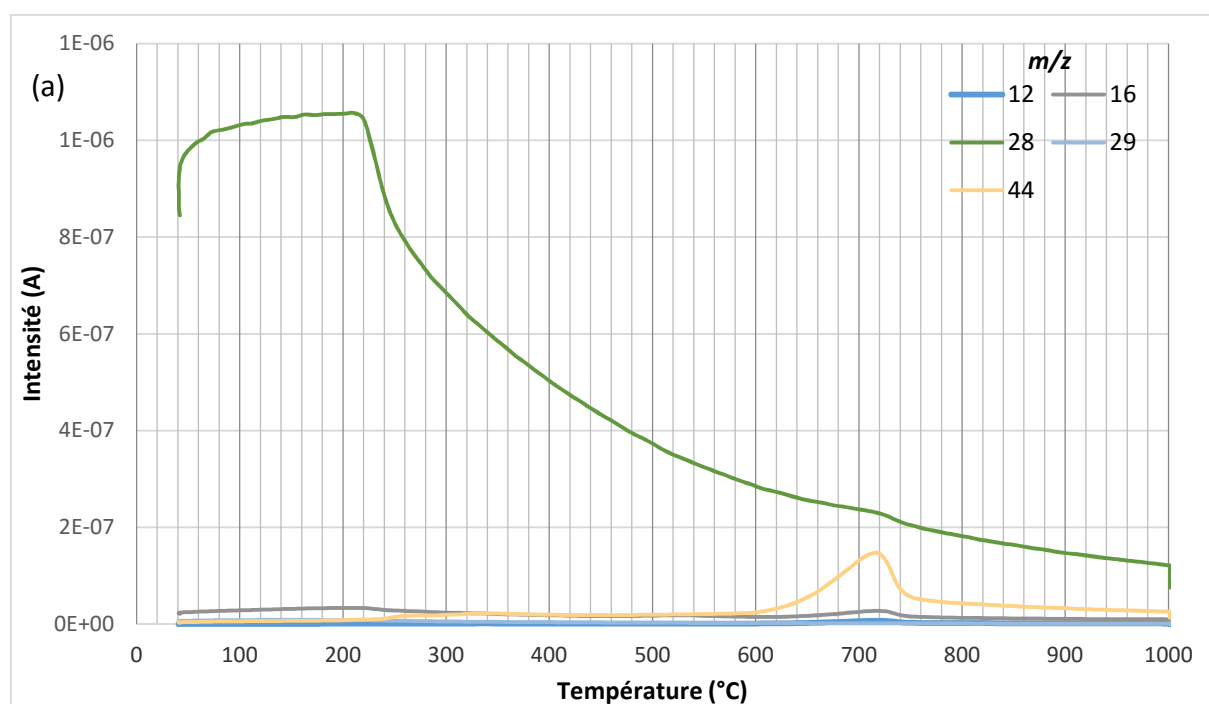


Figure III-29 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse de l' O_2 ; (b) spectre de masse typique de l' O_2

Dioxyde de carbone:

Les rapports m/z = 12, 16, 28 et 44 représentés sur le spectre de masse NIST (figure III-30.b)) peuvent correspondre aux ions $^{12}C^+$, $^{16}O^+$, $^{12}C^{16}O^+$, $^{12}C^{16}O_2^+$, tandis que les rapports m/z = 29, 45 et 46 pourraient correspondre aux ions $^{13}C^{16}O^+$, $^{13}C^{16}O_2^+$, et $^{12}C^{16}O^{18}O^+$, respectivement. Le rapport m/z = 22 peut correspondre à l'ion $^{12}C^{16}O_2^{++}$ (figure III-30.b)).

En observant la figure III-30.a), on peut reconnaître à travers le pic à 720°C la signature du CO₂, bien que l'intensité du rapport $m/z = 28$ soit plus forte que ce qu'il serait attendu en cas de dégagement seul de CO₂. On voit cependant que le CO₂ contribue à faire une épaule à 720°C sur la pente décroissante du rapport $m/z = 28$. Il est cependant plus difficile d'interpréter ce qui se passe en début d'analyse. En effet, le rapport $m/z = 28$ possède une intensité bien trop importante, relativement aux autres ions caractéristiques du spectre de masse du CO₂. Il provient sûrement de la libération d'une autre espèce, celle caractérisée par le plateau jusqu'à 211°C. De plus, cette forte intensité limite la lecture des intensités des autres rapports m/z . Supprimons donc le rapport $m/z = 28$ pour voir de plus près ce qui se passe (figure III-31).



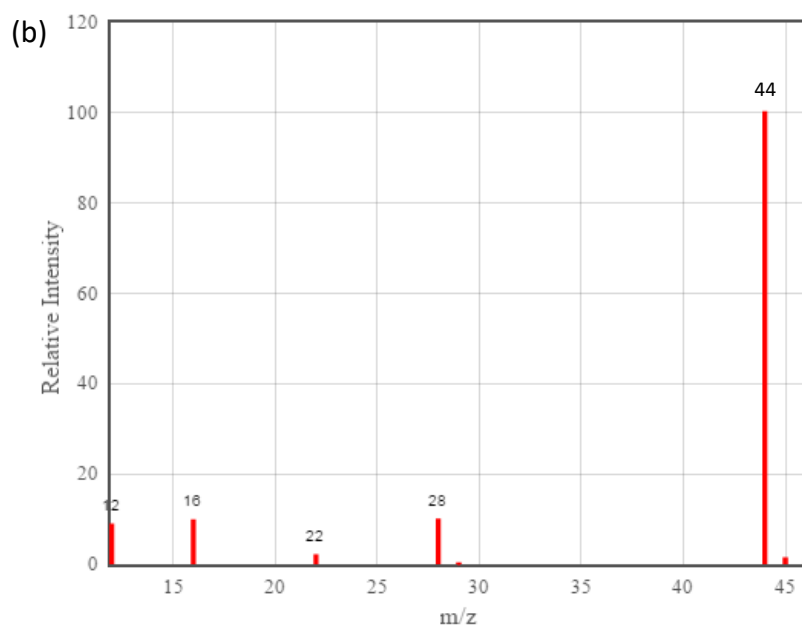


Figure III-30 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du CO_2 ; (b) spectre de masse typique du CO_2

Les intensités relatives des différents rapports m/z correspondent au spectre de masse du CO_2 et confirment la libération de cette espèce lors de la troisième étape, qui possède une intensité maximale à 720°C. Cependant, il est plus difficile d'interpréter sur ce qui se passe au début de l'analyse, étant donné que le rapport $m/z = 16$ peut provenir de plusieurs sources. Nous avons vu (figure III-28.b)) que le rapport $m/z = 12$ se comportait comme le rapport $m/z = 44$. Au vu des intensités relatives théoriques de ces deux rapports, et des intensités mesurées lors de l'expérience, on a donc probablement également une première libération de CO_2 , débutant à 239°C.

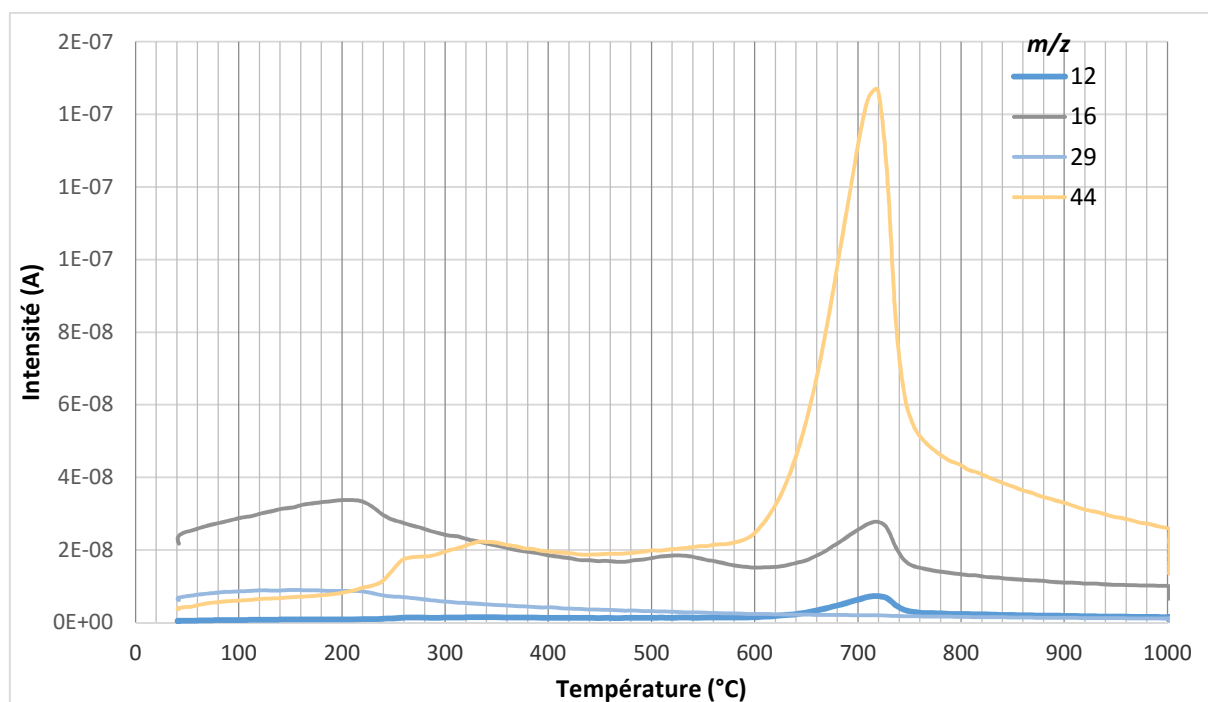


Figure III-31 : rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du CO_2 , sans la courbe représentant le rapport $m/z = 28$.

Eau:

Les rapports $m/z = 16, 17, 18$ représentés sur le spectre de masse NIST (figure III-32.b)) correspondent aux ions O^+ , OH^+ et H_2O^+ , respectivement. Les rapports $m/z = 19$ et 20 peuvent correspondre aux isotopes de ces espèces (par exemple, $^2\text{H}^1\text{HO}^+$ ou $\text{H}_2^{17}\text{O}^+$ pour $m/z = 19$, et $\text{H}_2^{18}\text{O}^+$ pour $m/z = 20$) (figure III-32.b)).

Au vu des intensités relatives théoriques des différents rapports m/z caractéristiques du spectre de masse de l'eau, et des données obtenues expérimentalement, nous pouvons voir que de l'eau est libérée, au cours de l'analyse, avec deux étapes de forte intensité (211°C et 527°C). Le pic du rapport $m/z = 16$ à 720°C est dû, comme interprété plus avant, à une libération de CO_2 (figure III-32.a)).

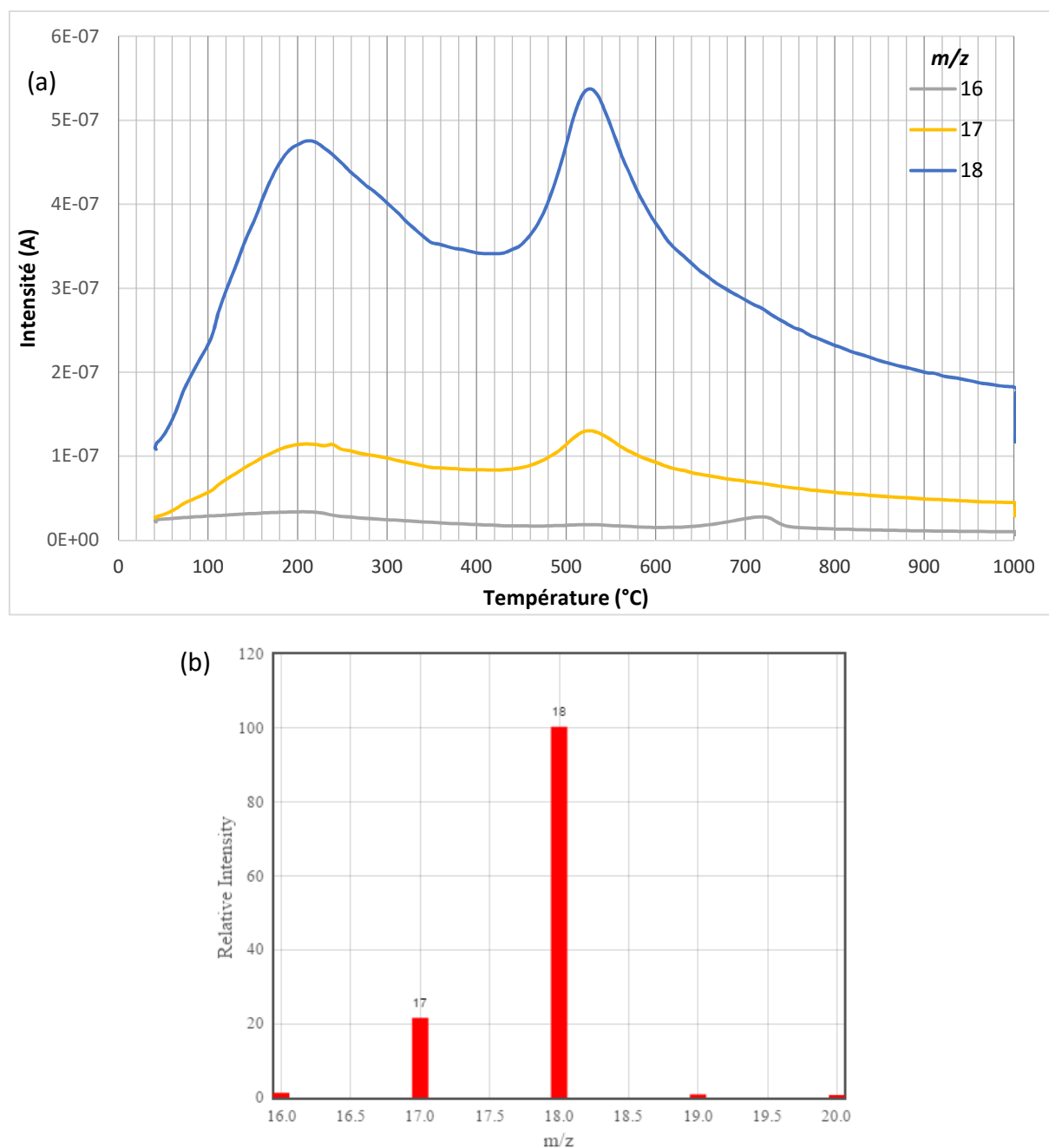
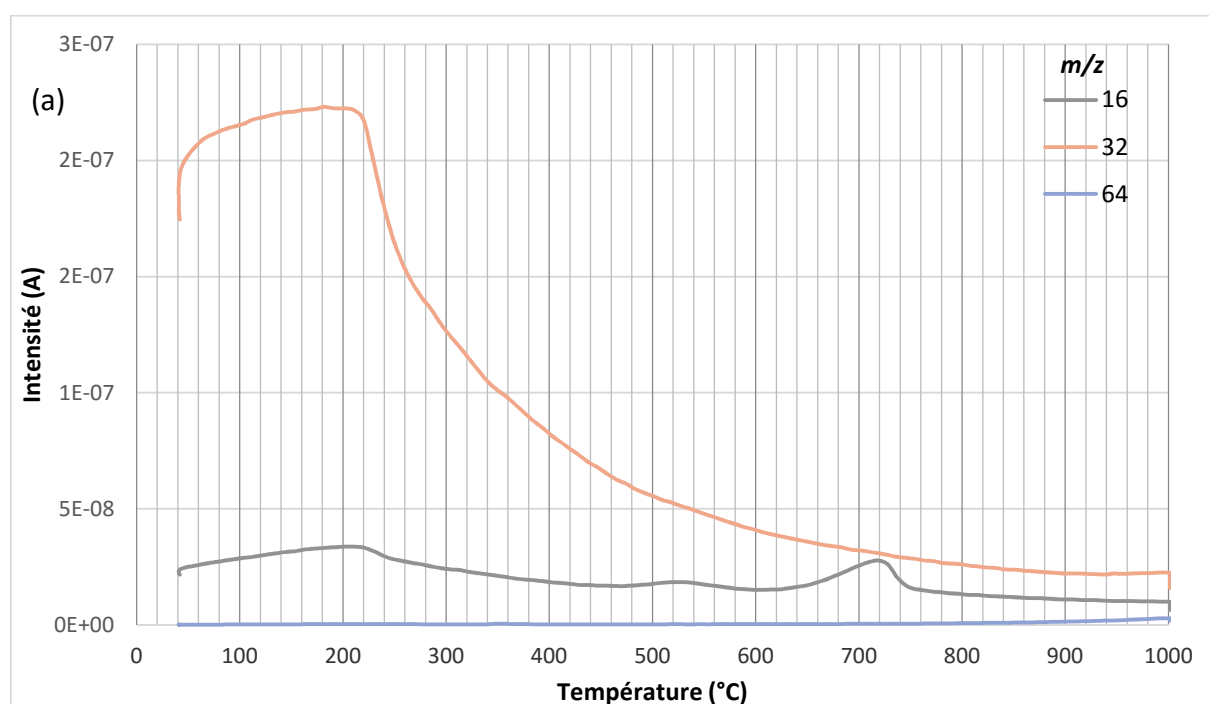


Figure III-32 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse de H_2O ; (b) spectre de masse typique de H_2O

Dioxyde de soufre:

Les rapports m/z = 16, 32, 48 et 64 représentés sur le spectre de masse NIST (figure III-33.b) correspondent aux ions O^+ , $^{32}S^+$, SO^+ , et SO_2^+ , respectivement. Les rapports m/z = 33 et 34 correspondent aux ions $^{33}S^+$ et $^{34}S^+$, respectivement. Les rapports m/z = 49, 50, 65 et 66 peuvent correspondre aux isotopes des ions SO^+ et SO_2^+ (par exemple $^{33}SO^+$ ou $^{32}S^{17}O^+$ pour m/z = 49 ; $^{34}SO^+$, $^{33}S^{17}O^+$ ou $S^{18}O^+$ pour m/z = 50) (figure III-33.b)).

Bien que l'on observe certains rapports m/z caractéristiques du SO_2 , le rapport $m/z = 48$ (deuxième rapport le plus abondant du spectre de masse du SO_2) n'a pas été détecté. De plus, les proportions relatives des différents rapports m/z mesurés au cours de l'analyse ne sont pas observées aux mêmes proportions qu'au sein du spectre de masse typique du SO_2 . Ce sont probablement d'autres sources qui contribuent à l'observation des m/z caractéristiques du SO_2 , par exemple l' O_2 , l'eau, et le CO_2 pour le rapport $m/z = 16$, et l' O_2 pour le rapport $m/z = 32$ (figure III-33.a)). On peut donc conclure qu'aucun SO_2 n'est libéré au cours de l'analyse, à part peut-être une légère libération vers la fin, dénotée par la présence du rapport $m/z = 64$; ainsi qu'une libération, dénotée par un pic d'intensité du rapport $m/z = 64$, à 350°C (figure III-28.c)). Cependant, aucun soufre n'a été détecté dans l'échantillon de sol d'Atacama lors de l'analyse élémentaire. Néanmoins, la spectrométrie de masse est une technique utilisant un détecteur plus sensible que le TCD (« Thermal Conductivity Detector ») utilisé en tant que détecteur par l'analyseur élémentaire.



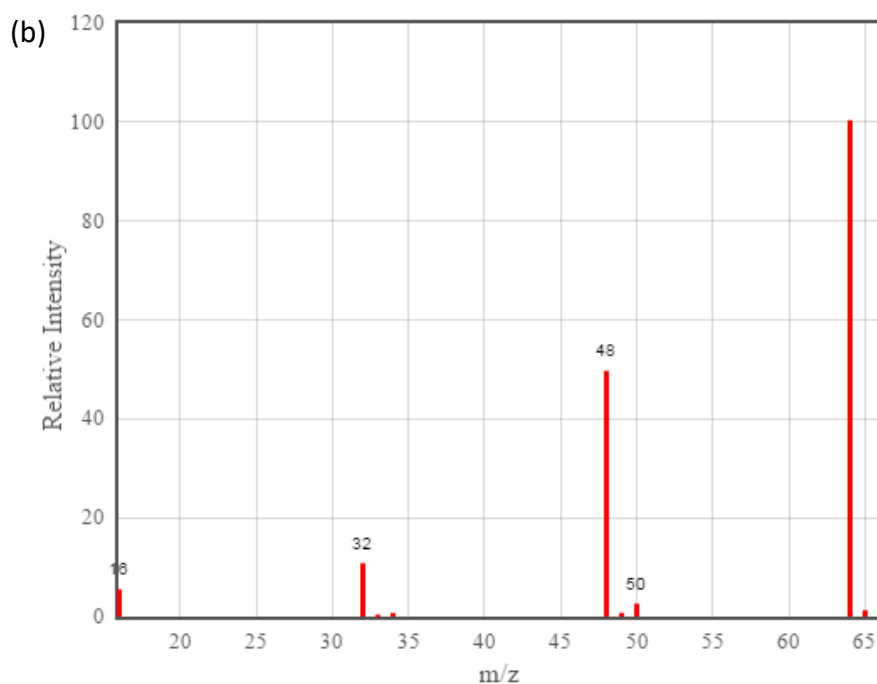


Figure III-33 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du SO_2 ; (b) spectre de masse typique du SO_2

Pour résumer, on peut supposer que la première étape (libération de deux espèces jusqu'à 211°C) correspond à une libération d'eau (l'espèce de type 2).

L'identification de l'espèce de type 1 (caractérisée par les rapports $m/z = 14, 16, 28, 29, 32, 40$ u) est plus difficile. Cela pourrait être du CO_2 , mais les rapports $m/z = 12$ et 44 u n'ont pas le même comportement. Cela pourrait être de l' O_2 ($m/z = 16, 32$ u). Cela pourrait également être du N_2 ($m/z = 14, 28, 29$). Cela pourrait être de l'air, cependant, dans ce cas, on devrait avoir le même comportement (plateau à 211°C) pour les $m/z = 16, 17$ et 18 u. Or, ce n'est pas le cas. Peut-être que vient s'y ajouter la libération d'eau du sol. Cependant, le rapport $m/z = 18$ devrait être plus intense que $m/z = 28$, à moins que du N_2 soit libéré du sol également. Or, aucun N n'a été détecté par analyse élémentaire.

La deuxième étape (pic d'intensité maximale à 527°C) correspondrait à une seconde libération d'eau.

La troisième étape (pic d'intensité maximale à 720°C) correspondrait à une libération de CO_2 . A noter que du CO_2 semble également être libéré à 270°C et 340°C. Du CO_2 de l'air pourrait être détecté jusqu'à 211°C, puis une libération de CO_2 du sol aux températures supérieures.

Apportons maintenant plus d'informations grâce aux données TG et DSC.

Etude des données TG et DSC, et corrélation avec les données obtenues par MS

L'analyse TG-DSC-MS sur Atacama nous permet de représenter la masse TG (en % de la masse initiale) et la dérivée de la masse par rapport au temps dTG (en $\%.\text{min}^{-1}$), qui permet de repérer les étapes de perte de masse (figure III-34). En effet, un pic sur la courbe dTG correspond à un taux de perte de masse plus rapide. Le point de départ initial d'un pic sur la courbe dTG correspond au début d'une réaction ou transformation, et la fin d'un pic correspond à la fin de la réaction ou transformation. La courbe dTG permet d'identifier le nombre d'étapes de perte de masse, et le moment où elles ont lieu.

Il est intéressant de noter que cinq principales étapes de perte de masse sont observées, aux températures de 69°C, 149°C, 278°C, 503°C, et 715°C. Ainsi, au cours du chauffage de ce sol, au moins cinq réactions chimiques ont lieu. Le premier pic dTG est constitué d'au moins trois pics.

Au cours de l'analyse, seulement 5% de la masse totale est perdue.

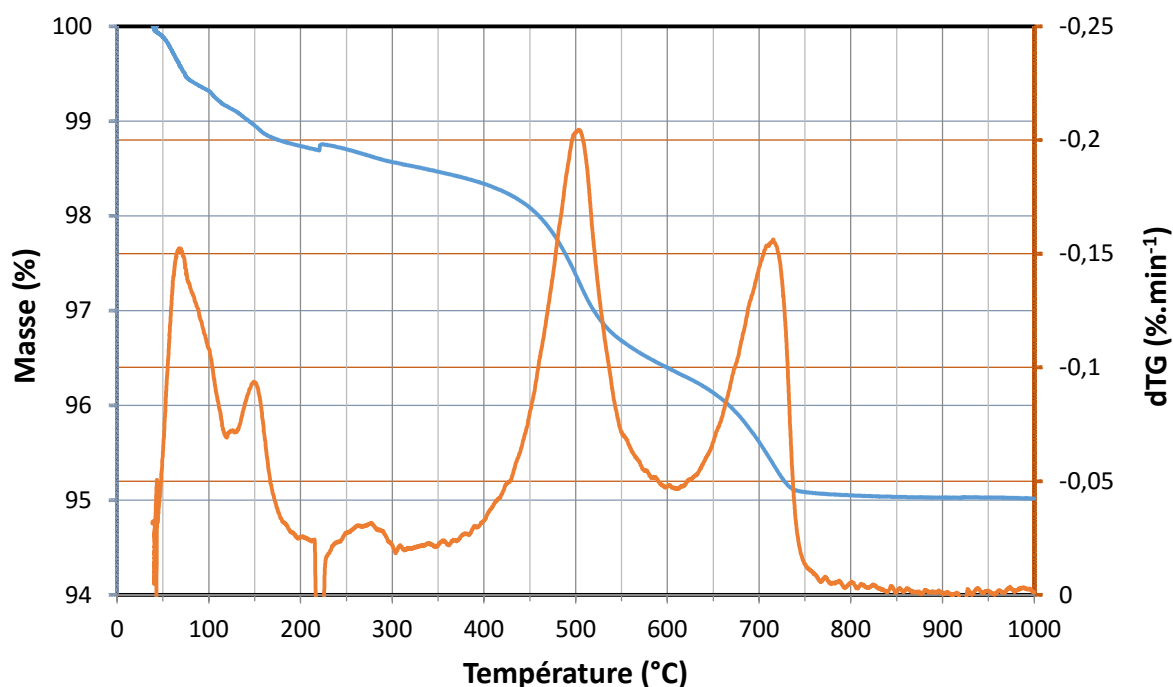
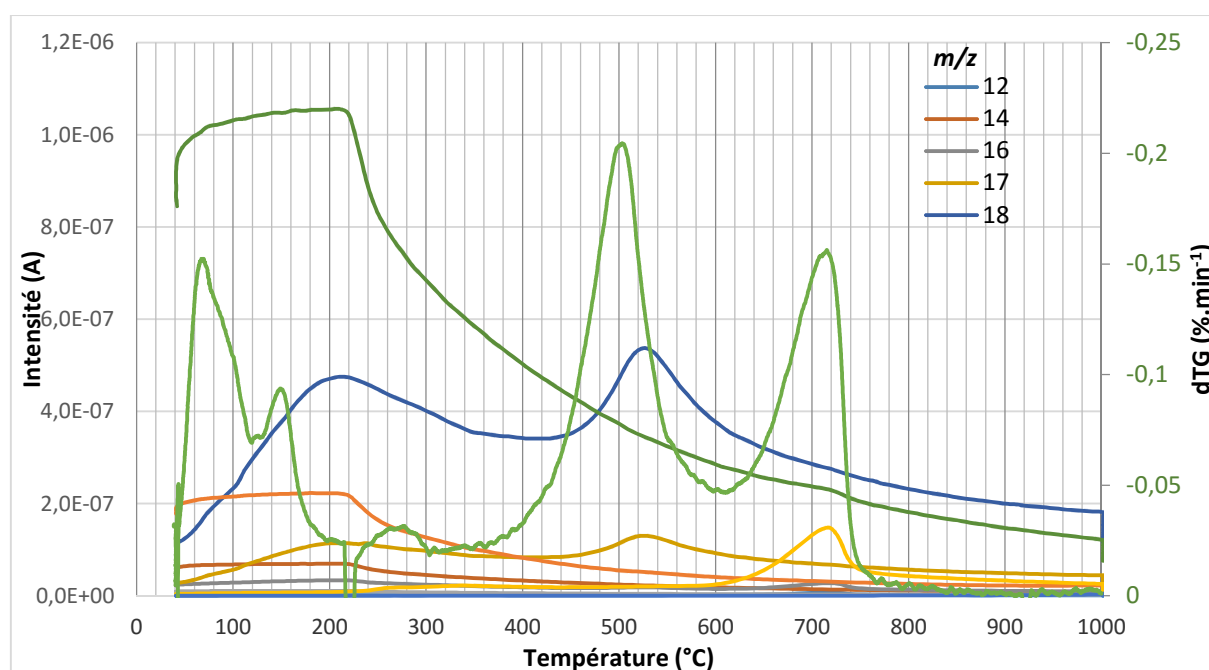


Figure III-34: courbes de TG et dTG pour Atacama. Chauffage à 10°C/min, sous atmosphère d'hélium.

L'artefact (cassure) aux alentours de 220°C pourrait être dû à un accident lors de l'analyse (par exemple un heurt de l'appareil ou de la table sur lequel il repose).

Comparons maintenant au sein de la même figure les courbes d'intensité des rapports m/z , et celle de la dTG ; en fonction de la température, sur une échelle normale (figure III-35) et sur une échelle logarithmique de base 10 (figure III-36).

Figure III-35 : courbes d'intensité des rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et courbe dTG ; en fonction de la température.

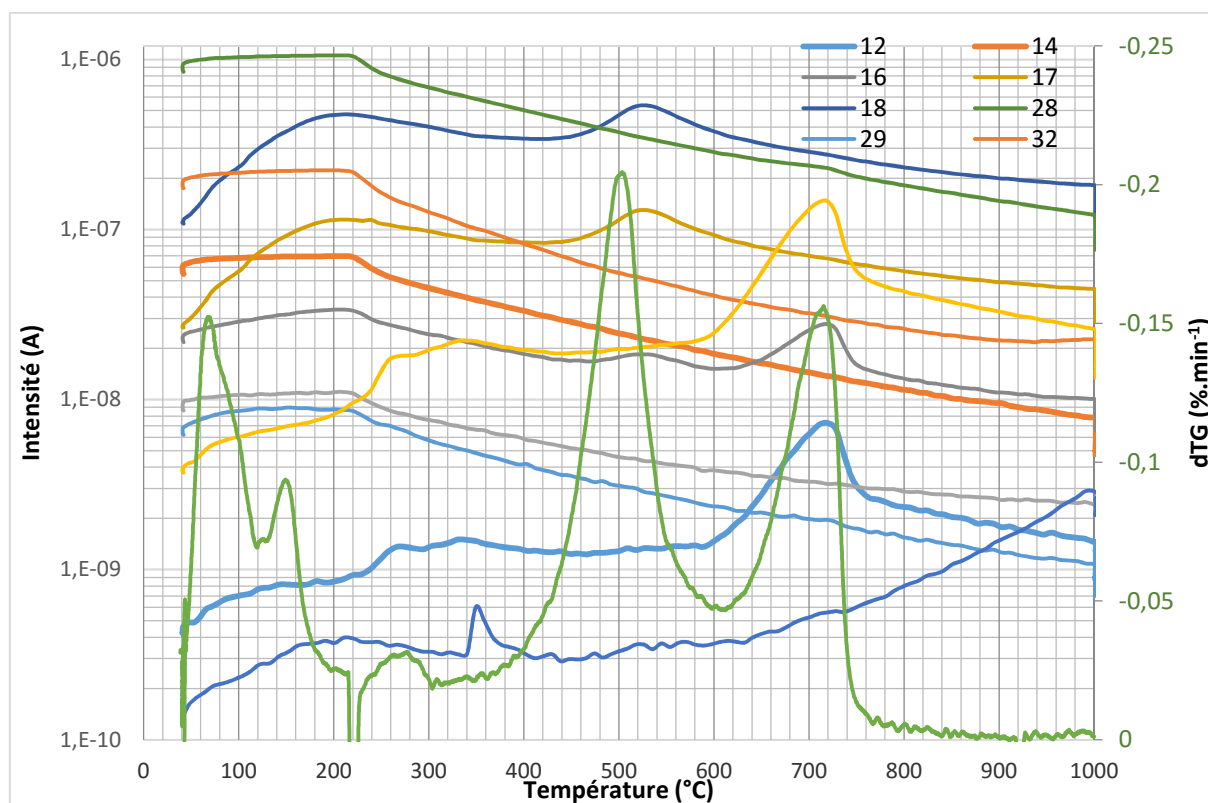


Figure III-36 : courbes d'intensité des rapports m/z détectés au cours de l'analyse (échelle logarithmique), et courbe dTG ; en fonction de la température.

Nous pouvons maintenant corréliser les cinq principales étapes de perte de masse (69°C, 149°C, 278°C, 503°C, et 715°C) avec les intensités des espèces relâchées au cours du chauffage.

La première étape (69°C) ne correspond (de manière exacte) à aucun pic d'intensité mesuré par le spectre de masse, sauf des pics mineurs sur les courbes des rapports $m/z = 12$, 44, 17 et 18. Donc peut-être une libération d'eau et de CO_2 .

La deuxième étape (149°C) ne semble correspondre à aucun pic particulier sur les courbes des intensités des rapports m/z . Cependant, la fin de cette étape (fin de la réaction chimique) concorde avec la libération maximale d'eau, d' O_2 , et de N_2 . Peut-être que ces deux premiers pics sur la courbe dTG correspondent à la libération d'eau. Cependant, dans le cas d'une présence d'air, peut-être que les pics d'intensité correspondants sont cachés par la présence d'air. Ou bien, ces deux étapes de perte de masse contribuent à l'observation du plateau (attribué à l' O_2 et au N_2 , donc présence d'air), ainsi qu'à la première étape de libération d'eau (culminant à 211°C).

La troisième étape (278°C) concorde avec une augmentation des intensités des rapports $m/z = 12, 29, 44$ (mesurée à 276°C). Cela correspond probablement une libération de CO_2 . Cette libération semble se poursuivre avec un autre pic d'intensité à 340°C, qui ne correspond pas à une accélération forte de la perte de masse, mais plutôt à de nombreuses petites.

La quatrième étape (503°C) précède la libération d'eau à 527°C. Une explication au fait que la mesure de la perte de masse précède la détection de l'espèce par le spectromètre de masse sera proposée au paragraphe portant sur l'analyse de l'échantillon de Svalbard.

La cinquième étape (715°C) correspond certainement (mais précède légèrement) la libération importante de CO_2 (720°C).

Le pic du rapport $m/z = 64$ (à 350°C) ne semble pas correspondre à une perte de masse lors de l'analyse. Il en va de même concernant l'augmentation de son intensité en fin d'analyse. Si libération de SO_2 il y a, elle correspond à une masse très faible de sol (ce qui confirme ce qu'on avait déduit de la faible intensité des rapports m/z caractéristiques du SO_2).

Le thermogramme DSC est comparé à la courbe dTG dans la figure III-37. On peut voir un premier pic anormalement intense, qui correspond probablement à un artefact causé par le temps nécessaire à l'appareil pour se stabiliser (ce phénomène a déjà été observé lors de ce type d'analyse, et est qualifié d'« overflow » ; Lu, communication personnelle). Lors d'analyses DSC avec des rampes de températures plus faibles (par exemple $0,1^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$), cet overflow est terminé bien avant que les premières variations de flux de chaleur ne soient mesurées. Nous utilisons une rampe de température comparativement plus importante (d'un facteur 100), ce qui explique que l'overflow ne soit pas terminé lorsque les premières variations sont mesurées (Lu, communication personnelle).

Cet artefact rend ininterprétable la nature des trois premières réactions principales.

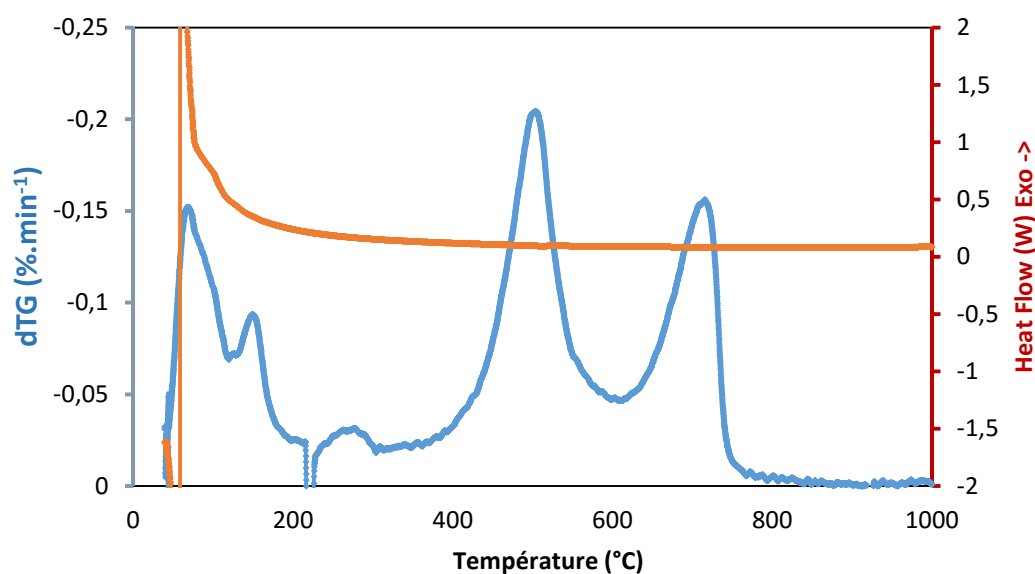


Figure III-37: courbes de dTG et DSC pour Atacama. Chauffage à $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium

Cependant, en zoomant sur la partie de la courbe concernant les deux dernières pertes de masse (figure III-38), nous pouvons observer deux réactions endothermiques. La première correspond à la seconde libération d'eau. La deuxième correspond à la libération de CO_2 .

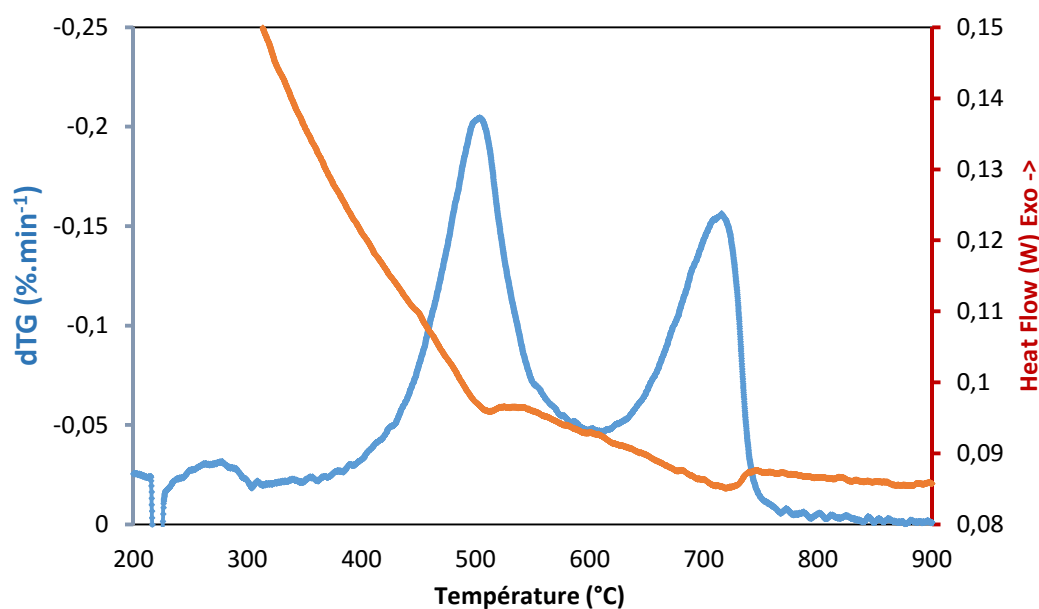


Figure III-38 : courbes de dTG et DSC pour Atacama (zoom sur une partie de la courbe). Chauffage à $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium

Pour poursuivre l'interprétation, on peut observer plusieurs étapes au cours de cette analyse :

(i.a) Une détection d'une espèce avec plateau à 211°C, pouvant correspondre aux étapes de perte de masse à 69°C et 149°C. Cette espèce pourrait être de l'O₂, dont la détection pourrait être causée par la vaporisation de H₂O₂. Ce dioxygène n'est probablement pas libéré par des perchlorates, puisque nous aurions observé la libération de Cl (m/z 35). Il n'est probablement pas libéré non plus par des oxydes métalliques, puisque ces derniers se décomposent à des températures plus importantes.

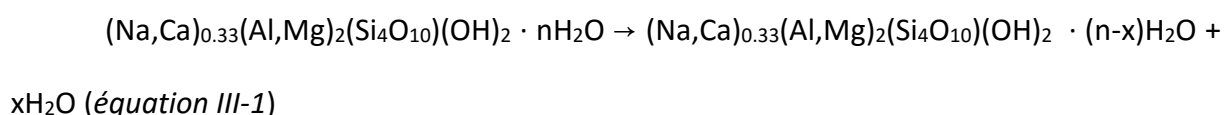
Cette détection est concomitante avec une détection d'une espèce m/z 28, montrant le même comportement. Cette espèce pourrait être du CO, provenant de molécules organiques se décarboxylant ou subissant une combustion. En effet, le CO peut être l'espèce volatile principale résultant de la combustion (sous l'effet de l'O₂) ou de la décarboxylation de certaines molécules organiques (Eigenbrode *et al.*, 2014).

Cependant, il existe une hypothèse alternative : la présence des rapports m/z 32 et m/z 28 pourrait être causée par de l'O₂ et du N₂ (respectivement) provenant d'air contenu dans le four, progressivement chassé par l'hélium au cours de l'analyse (ce qui expliquerait le plateau à 211°C suivi d'une courbe décroissante). Ceci impliquerait que le four a été mal purgé avant analyse. Il reste un doute quant à cette interprétation, puisque si l'espèce montrant un plateau à 211°C était bien de l'air, m/z 44 aurait le même comportement. Or ce n'est pas le cas. De même, si m/z 28 était causé par le CO provenant de décarboxylation de molécules organiques, il y aurait aussi le rapport m/z 44 (CO₂) qui aurait le même comportement. Cependant, le comportement de plateau du rapport m/z 44 peut être absent car caché par la libération de CO₂ qui commence dès la fin du plateau à 211°C, et qui est probablement causée par la décarboxylation / combustion de molécules organiques ; cet aspect sera développé plus en détail au point (ii).

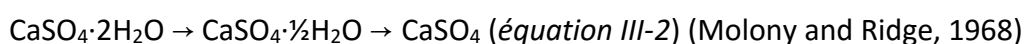
(i.b) une libération d'eau, culminant à 211°C, qui peut elle aussi correspondre aux deux étapes de perte de masse (69°C et 149°C). Aucune interprétation sur la nature exothermique ou endothermique de ces réactions ne peut être faite, à cause de l'artefact du thermogramme, mais elles correspondent certainement à la perte d'eau non structurale d'un ou plusieurs

minéraux : eau de porosité, eau adsorbée, eau de solvation, eau inter-feuillets (dans le cas de la présence de phyllosilicates), ou eau de cristallisation.

La première étape de perte de masse (69°C) pourrait par exemple correspondre à la déshydratation d'une smectite de magnésium, par perte de son eau de porosité et de son eau adsorbée. La deuxième perte de masse (149°C) pourrait correspondre à la perte de son eau inter-feuillets (*équation III-1*) ou de son eau de solvation. En effet, la déshydratation d'une smectite de magnésium se déroule entre 25 et 250°C, avec une libération d'eau adsorbée commençant au début de l'analyse et se terminant à environ 250°C, les dernières étapes de cette déshydratation pouvant inclure la perte d'eau inter-feuillets et d'eau de solvation (Karathanasis, 2008). Prenons pour exemple de réaction celle de la déshydratation de la montmorillonite par perte de son eau inter-feuillets:



La deuxième perte de masse (149°C) pourrait également correspondre à la perte de l'eau de cristallisation d'un minéral, tel qu'un sulfate hydraté, comme le gypse, pour lequel la déshydratation se déroule entre 100 et 350°C (Karathanasis, 2008 ; cependant l'auteur y inclut également l'eau adsorbée, et ne précise pas à quelle température l'eau de cristallisation commence à être libérée. D'autres études ont montré que la perte d'eau de cristallisation du gypse peut se dérouler à des températures inférieures à 100°C, comme 90,5°C [Ostroff, 1964] ou 85°C [Molony and Ridge, 1968]). La perte de l'eau de cristallisation du gypse se déroule en trois étapes, par une conversion du gypse en bassanite $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (parfois appelée hémihydrate) puis en anhydrite CaSO_4 :



Cette deuxième perte de masse (149°C) pourrait en outre être causée par la déshydroxylation de jarosite de potassium (gamme 130 – 330°C) (Frost *et al.*, 2005), ou la déshydratation (par perte de l'eau d'adsorption) d'alunite de potassium (gamme 50 – 220°C) (Frost *et al.*, 2006).

Cependant, la présence de sulfates dans l'échantillon est peu probable, étant donné que l'on n'a pas détecté de SO_2 ni de SO_3 au cours de l'analyse, mis à part un pic du rapport m/z 64 de faible intensité à 350°C, qui ne peut être attribué à aucune alunite ou jarosite étudiée par Frost *et al.* (2005, 2006). En effet, la libération de SO_2 (résultant de la

désulfatation) se produit dans la gamme 501 – 622°C pour la jarosite de potassium, et 555 – 595°C pour la jarosite de sodium. La libération de SO_3 (résultant également de la désulfatation) se produit à 531°C pour la jarosite de plomb, 680°C pour l'alunite de potassium, dans la gamme 644 – 733°C pour la jarosite de sodium, et dans la gamme 640 – 799°C pour la jarosite d'ammonium (Frost *et al.*, 2006, 2005).

De plus, la dégradation de l'anhydrite CaSO_4 (gypse déshydraté) en CaO et SO_3 ne se fait qu'à partir d'environ 1200°C (Newman, 1941).

N'ayant pas plus d'informations quant à la minéralogie de ce sol, il est difficile d'interpréter plus avant, puisqu'un chevauchement significatif d'évènements de perte de masse peut se dérouler dans cette gamme de température, si l'échantillon contient certains autres minéraux (*cf.* paragraphe 3.2.2.1). En effet, cet échantillon (provenant du site AT02-22, collecté en 2003) a été caractérisé par Navarro-González *et al.* (2006), mais seulement d'un point de vue de la matière organique totale. De plus, les échantillons d'Atacama caractérisés par Stalport *et al.* (2012), collectés en 2006, proviennent d'un site différent (27°20.2'2''S 70°42.4'4''W ; c'est-à-dire AT01-23 ou AT02-23 ; *cf.* paragraphe 1.5.2.3.a) au chapitre I) du nôtre (28°07'04.5''S 69°55'08.0''W).

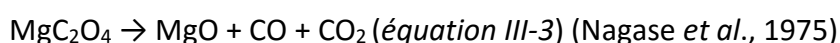
(ii) une libération de CO_2 avec deux pics d'intensité (276°C et 340°C), qui correspondent à une augmentation de la vitesse de perte de masse lors du premier (maximum à 278°C), et à de multiples augmentations de la vitesse lors du deuxième pic d'intensité. Ceci pourrait correspondre à deux étapes de décarbonatation, et donc indiquer la présence de carbonates dans le sol, bien que ces températures paraissent relativement faibles pour une décarbonatation. En effet, la décarbonatation des carbonates commence habituellement entre 450°C au minimum (sidérite, gamme 450 – 600°C) et 750°C au maximum (calcite, gamme 750 – 900°C).

Il est cependant possible que cette détection de CO_2 soit causée par la décarboxylation de molécules organiques présentes dans l'échantillon.

En effet, Eigenbrode *et al.* (2014) ont montré que la détection de CO_2 au cours d'une analyse thermique pouvait être causée par la décarboxylation de molécules telles que des sels d'hydrogénocarbonates HCO_3^- , d'oxalates $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, ou d'acétates CH_3CO_2^- ; des esters tels que le diméthyl oxalate $(\text{CH}_3)_2(\text{COO})_2$ ou diéthyl oxalate $(\text{C}_2\text{H}_5)_2(\text{COO})_2$; ainsi que des acides, tel que l'acide oxaloacétique $\text{HO}_2\text{CC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, acide mellitique (ou acide benzène

hexacarboxylique), acide phtalique $C_6H_4(CO_2H)_2$, acide benzène tricarboxylique, acide benzène tétracarboxylique, ou encore acide naphtalène dicarboxylique. Ces différentes molécules peuvent subir une décarboxylation dans des gammes de températures variées. Certains composés simples, tels que les oxalates, acétates et l'acide mellitique subissent une décarboxylation avec libération de CO_2 à partir de $150^\circ C$. D'autres peuvent subir une décarboxylation à des températures bien plus importantes, tel que l'hydrogénocarbonate de sodium (gamme $780 - 890^\circ C$). Certains composés plus complexes peuvent libérer du CO_2 par décarboxylation sur une large gamme de température, tel que l'acide mellitique (250 à plus de $800^\circ C$) (Eigenbrode *et al.*, 2014).

A titre d'exemple, l'oxalate de magnésium se décarboxyle dans la gamme $250 - 300^\circ C$, selon l'équation :



L'absence d'observation de contre-ions de sels d'hydrogénocarbonates, d'oxalates, ou d'acétates n'infirme pas forcément l'hypothèse de la présence de ces sels dans l'échantillon. En effet, Eigenbrode *et al.* (2014) ont montré que pour certaines molécules, telles que les oxalates ou les hydrogénocarbonates, les seuls produits de décarboxylation observés étaient le CO_2 et le CO.

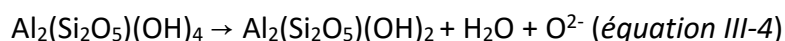
Une autre possibilité pour la détection du dioxyde de carbone à ces températures relativement faibles ($276^\circ C$ et $340^\circ C$) est la libération de CO_2 par combustion de la matière organique, sous l'action de l' O_2 observé lors de l'analyse (Eigenbrode *et al.*, 2014).

L'observation de CO_2 à ces températures pourrait enfin être causée par la dégradation de carbonates réagissant avec du HCl provenant de composés oxychlorés (Eigenbrode *et al.*, 2014). Cependant, nous pouvons infirmer cette hypothèse, puisque nous n'avons pas observé de chlore (m/z 35), ni de HCl (m/z 36) au cours de notre analyse.

(iii) puis une nouvelle libération d'eau avec un maximum à $527^\circ C$ (précédée d'une perte de masse avec un maximum à $503^\circ C$). Le caractère endothermique de cette réaction, et sa température, indiquent la déshydroxylation (perte d'eau structurelle) d'un minéral hydraté (c'est-à-dire contenant de l'eau sous forme OH dans sa structure). Comme expliqué plus avant, nous pouvons éliminer l'hypothèse de la déshydroxylation d'une alunite ou jarosite.

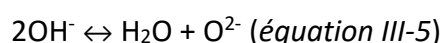
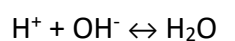
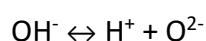
Plus probablement, cela correspondrait à la déshydroxylation de kaolinite, halloysite, endellite (phyllosilicates 1:1 ; gammes 400 - 600°C), ou encore d'hectorite ou d'un mica (phyllosilicates 2:1 ; gammes 500 – 900°C).

Pour la déshydroxylation de la kaolinite, halloysite (déshydratée) et endellite (déshydratée), nous pouvons proposer l'équation suivante :



L'halloysite et l'endellite déshydratées (en effet, si elles sont bien présentes au sein de l'échantillon, ces deux espèces minérales auront perdu leur eau non-structurale plus tôt au cours du chauffage) sont de même formule que la kaolinite, la réaction s'écrit donc de la même manière.

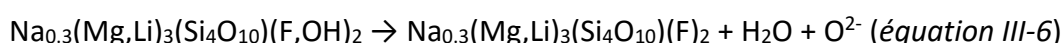
L'ion O^+ , responsable du pic du rapport $m/z = 16$ à 527°C, peut donc provenir non seulement de la fragmentation de la molécule d'eau, mais aussi être causé par la présence de l'anion superoxide O^{2-} , produit de la réaction de déshydroxylation de type $2\text{OH}^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}^{2-}$ (Yeskis *et al.*, 1985). Dans les deux cas, l'observation de cet ion à cette température au sein de notre expérience provient de la déshydroxylation de phyllosilicates. Plus précisément, cette réaction de déshydroxylation peut être écrite de la manière suivante :



En effet, ce mécanisme de déshydroxylation (généralement accepté comme étant le mécanisme de déshydroxylation de la kaolinite) résulte de l'interaction de deux groupements hydroxyles via un processus en deux étapes, résultant en la formation d'une molécule d'eau par transfert d'un proton, et en la formation d'un anion O^{2-} (équation III-5). Ces étapes requièrent la délocalisation de protons à des sites hydroxyles spécifiques. Afin de permettre la formation de la molécule de H_2O , le proton doit migrer vers un second site hydroxyle. Si deux hydroxyles adjacents sont impliqués dans ce processus en deux étapes, alors le processus sera homogène. Cependant, si les hydroxyles impliqués ne sont pas adjacents, le processus requiert la diffusion du proton (parfois appelé « proton hopping »), avec la formation de molécules d'eau se produisant à la surface du minéral (Frost and Vassallo, 1996).

Le mécanisme de déshydroxylation de l'halloysite n'est pas exactement identique à celui de la kaolinite (Frost and Vassallo, 1996). Cependant, la plupart des phyllosilicates partagent la même structure de base (réseau de tétraèdres SiO_4^{4-} interconnectés, formant des espaces de forme hexagonale où les ions OH^- peuvent s'immiscer, cf. figure I-18 et I-19 au chapitre I). Nous pouvons ainsi supposer que même si les mécanismes intermédiaires de déshydroxylation sont différents selon les phyllosilicates, l'équation-bilan conservera la même nature (perte de deux molécules de OH^- et production d'une molécule d'eau et d'un anion O^{2-}). Les groupements OH^- faisant partie intégrante de la structure (plus précisément de la couche octaédrique) des phyllosilicates, il est probable que le minéral écrit en produit de l'équation ne soit qu'un intermédiaire dans un mécanisme de dégradation global du minéral d'origine.

Proposition d'équation de la déshydroxylation de l'hectorite :



Proposition d'équation de la déshydroxylation d'un mica, prenons l'exemple de la muscovite :



(iv) puis une libération intense de CO_2 (720°C) correspondant à une perte de masse (maximum à 715°C). Le caractère endothermique de cette réaction et sa température élevée indiquent la décarbonatation d'un carbonate, tel que la dolomite (gamme 500 – 950°C), la magnésite (gamme 500 – 750°C), ou encore le carbonate de sodium Na_2CO_3 (gamme 500 – 1000°C) (Karathanasis, 2008).

Il est peu probable que le carbonate que nous observons soit la dolomite, car elle montre deux pics endothermiques (figure III-39) : le premier correspond à la décomposition de la structure de la dolomite, libérant du dioxyde de carbone, de l'oxyde de magnésium, et de la calcite (CaCO_3) (équation III-8) ; et le second correspond à la décomposition de la calcite (équation III-9) (Gunasekaran and Anbalagan, 2007). De plus, on ne détecte pas le rapport m/z 56 (causé par la libération de CaO).

Dolomite : (Gunasekaran and Anbalagan, 2007)



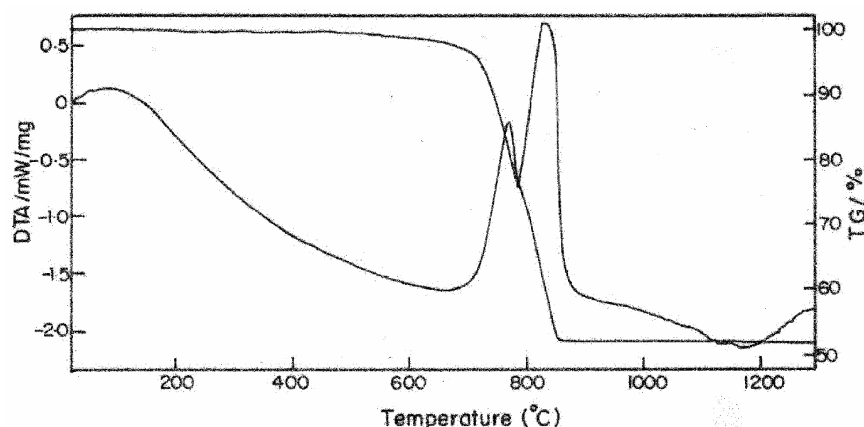


Figure III-39 : courbes TG et ATD de la dolomite (dans Gunasekaran and Anbalagan, 2007)

Magnésite



Si la décarbonatation de magnésite était responsable de la libération de CO_2 à 720°C , nous observerions probablement un pic de rapport m/z 40 (MgO) à cette température. Cependant, l'espèce de type 1, qui contribue à l'observation du m/z 40 tout au long de l'analyse, nous empêche de confirmer l'hypothèse de la décarbonatation de magnésite à cette température.

Carbonate de sodium



Cependant, nous ne détectons pas le rapport m/z 62 (masse molaire de Na_2O), ni m/z 23 (masse molaire Na).

Il est donc possible que le carbonate observé soit du carbonate de sodium, voire plus probablement de la magnésite. Cependant, la confirmation de la présence de magnésite n'est pas possible.

Il est également intéressant de revenir sur la possible faible libération de SO_2 (avec un maximum à 350°C et une augmentation graduelle en fin d'analyse), bien que le rapport m/z 48 (SO) n'ait pas été détecté au cours de l'analyse. Une possible libération de SO_2 à 350°C

pourrait correspondre à la perte de soufre par un minéral tel que la pyrite FeS_2 (Karathanasis, 2008). Bien qu'aucun S n'ait été détecté dans l'échantillon de sol d'Atacama lors de l'analyse élémentaire, cela ne veut pas dire qu'aucun S n'est présent dans l'échantillon. En effet, le spectromètre de masse est plus précis que le TCD utilisé pour l'analyse élémentaire. Cependant, la pyrite perd son soufre en théorie seulement à partir de 400°C (Karathanasis, 2008).

La libération de SO_2 à partir de pyrite peut également se produire en présence d' O_2 , mais dans une gamme de température plus élevée:

$\text{FeS}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{FeS} + \text{SO}_2$ (gamme $560 - 688^\circ\text{C}$) (*équation III-12*) (Pelovski and Petkova, 1999)

Nous avons vu plus avant que l'hypothèse de la désulfatation d'une alunite ou jarosite était exclue (température trop faible).

Cette observation d'un pic du rapport m/z 64 à 350°C provient donc peut-être à la place de la libération d'un produit de la décarboxylation ou de la combustion d'une molécule organique. En effet, ce phénomène se produit en même temps que la libération de CO_2 à partir de supposées molécules organiques (*cf.* étape (ii)).

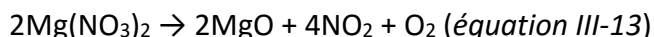
Concernant l'augmentation graduelle en fin d'analyse, il est possible que lors de l'analyse de l'échantillon de Rio Tinto, réalisée avant celle de l'échantillon d'Atacama, du soufre ait été adsorbé dans l'appareil, et qu'il ait été désorbé lors des hautes températures atteintes en fin d'analyse de l'échantillon d'Atacama.

On aurait pu s'attendre, au cours de cette analyse, à observer la libération de chlore, d'iode, de chrome, ou de nitrates NO_3^- . En effet, le désert d'Atacama est connu pour ses dépôts importants de nitrates, contenant des espèces fortement oxydantes, incluant des ions iodate (IO_3^-), chromates (CrO_4^{2-}), et perchlorates (ClO_4^-) (Ericksen, 1981, dans Quinn *et al.*, 2005).

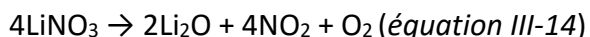
Cependant, nous n'observons aucune libération de chlore (m/z 35), ni d'iode (m/z 127) ou de chrome (m/z 52). Il semblerait donc que cet échantillon ne contienne pas de perchlorates, ni d'ions iodates ou chromates.

Qu'en est-il des nitrates NO_3^- ? Tous les nitrates du groupe 2 (c'est-à-dire dont le contre-ion est un des métaux de la colonne 2 du tableau périodique) se décomposent en

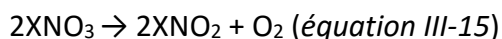
produisant l'oxyde métallique, du NO₂ et du dioxygène. Par exemple, le nitrate de magnésium se décompose selon l'équation suivante :



Au sein du groupe 1, le nitrate de lithium se comporte de la même manière :



Le reste des nitrates du groupe 1, cependant, se décomposent en produisant le nitrite métallique et du dioxygène, selon l'équation :



Or, nous n'observons pas le rapport $m/z = 30$, pic majoritaire du spectre de masse typique du NO₂. Nous n'avons donc probablement pas de nitrates dans notre échantillon.

Pour résumer (tableau III-6), au cours de l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol de Svalbard (AT02-22), nous avons pu constater la libération de dioxygène entre 50 et 211°C (suivi d'un long « tailing »), possiblement entraînée par une vaporisation de H₂O₂, ainsi qu'une libération simultanée de CO, possiblement causée par la décarboxylation ou la combustion de molécules organiques. Alternativement, le rapport m/z attribué au CO est causé par le N₂, et la présence de dioxygène et de diazote est causée par le fait que le four n'a pas été correctement purgé de son air avant analyse.

De l'eau est libérée dès le début d'analyse et l'intensité de la libération atteint un maximum à 211°C. Cette libération est associée à deux étapes de perte de masse (69°C et 149°C). La première étape de perte de masse correspond probablement à une libération d'eau de porosité du sol ou d'eau adsorbée à la surface de minéraux. La deuxième étape correspond possiblement à la libération d'eau inter-feuillets (dans le cas de la présence de smectite, ou d'un autre phyllosilicate capable d'incorporer de l'eau entre ses feuillets), ou bien d'eau adsorbée à la surface d'un minéral, d'eau de solvation, ou d'eau de cristallisation.

Du CO₂ est libéré à deux reprises (maxima à 276°C et 340°C), correspondant possiblement à la combustion (sous l'effet de l'O₂) ou décarboxylation de molécules organiques.

De l'eau est à nouveau libérée, avec un maximum à 527°C, pouvant provenir de la déshydroxylation d'un phyllosilicate de type TO (1:1) ou TOT:O (2:1:1 ou 2:2).

Enfin, du CO₂ est à nouveau libéré (maximum à 720°C), correspondant probablement à la décarbonatation d'un carbonate, possiblement de la magnésite.

L'échantillon ne semble pas contenir de sulfates, ni de nitrates ou de perchlorates.

Etapes de libération	Températures de libération	Espèce(s) libérée(s)	Perte(s) de masse (pics DTG)	Phénomène(s)
(i.a)	gamme 50-211°C	O ₂ ; N ₂ ou CO	69°C et 149°C	Vaporisation de H ₂ O ₂ , présence d'air, décarboxylation (e.g., <i>éq.III-3</i>) ou combustion de molécules organiques
(i.b)	211°C	H ₂ O	69°C	Libération d'eau de porosité et d'eau adsorbée
			149°C	Libération d'eau inter-feuillets (dans le cas de la présence de smectite, e.g., <i>éq.III-1</i>), d'eau adsorbée, d'eau de solvatation, ou d'eau de cristallisation (e.g., <i>éq.III-2</i>)
(ii)	276°C	CO ₂	278°C	Décarboxylation (e.g., <i>éq.III-3</i>) ou combustion de molécules organiques
	340°C		multiples	
(iii)	527°C	H ₂ O	503°C	Déshydroxylation d'un phyllosilicate 1:1 (e.g., <i>éq.III-4</i>) ou 2:1 (e.g., <i>éq.III-6</i> , <i>éq.III-7</i>)
(iv)	720°C	CO ₂	715°C	Décarbonatation d'un carbonate, e.g. magnésite (<i>éq.III-10</i>)

Tableau III-6 : résumé des étapes de libération d'espèces au cours de l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol d'Atacama

3.4.2.3.2) Svalbard

Pour l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol de Svalbard, constitué de smectite (une argile capable d'absorber de l'eau entre ses feuillets TOT), et de traces de magnésite (carbonate), la masse de sol utilisée est de 72,57 mg. Le matériau de référence est Al₂O₃, de masse 66,89 mg. Le gaz inerte est de l'hélium. Le programme de température est constitué d'une rampe de 10°C.min⁻¹, avec une température initiale de 20°C, jusqu'à 1000°C.

Etude de l'évolution de l'intensité des fragments détectés, en fonction du gradient de température

La figure III-40 est la représentation trois dimensions d'un scan TG-DSC-MS de Svalbard.

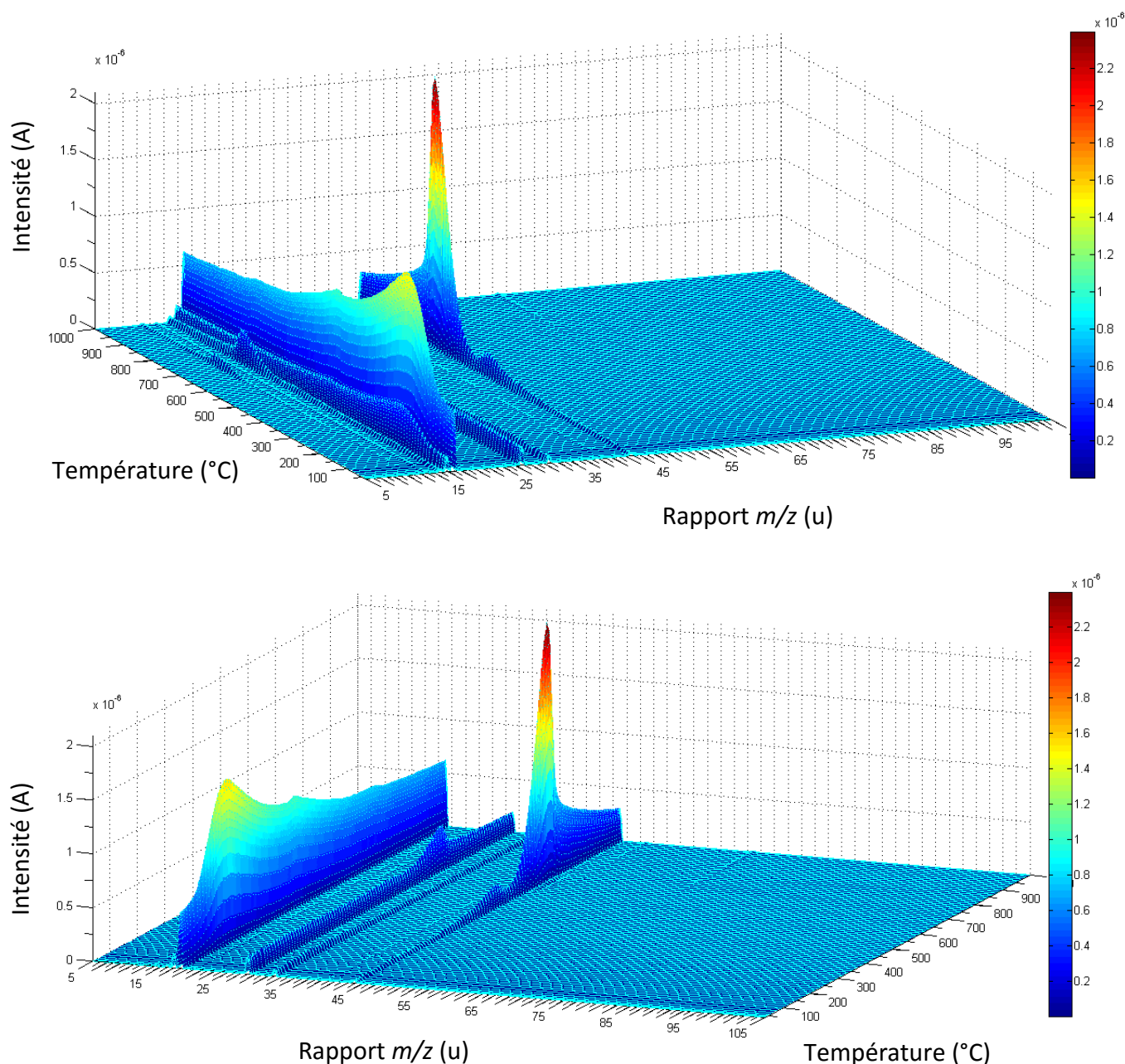


Figure III-40: Représentations graphiques (montrant la même figure sous deux angles différents) d'une analyse TG-DSC-MS sur un échantillon de sol de Svalbard. Chauffage à $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium.

Sur la figure III-41, permettant une lecture plus aisée de l'axe des abscisses et des ordonnées, on voit que les rapports m/z moyens les plus abondants au cours du gradient de température sont les suivants : 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 28, 29, 32, 40, 44, 45, 46, 48 et 64, avec des intensités maximales de $1,1 \cdot 10^{-7}$, $9,83 \cdot 10^{-9}$, $2,99 \cdot 10^{-7}$, $3,72 \cdot 10^{-7}$, $1,53 \cdot 10^{-6}$, $6,2 \cdot 10^{-9}$, $9,8 \cdot 10^{-9}$, $4,17 \cdot 10^{-7}$, $5,14 \cdot 10^{-9}$, $7,49 \cdot 10^{-8}$, $5,78 \cdot 10^{-9}$, $2,39 \cdot 10^{-6}$, $2,63 \cdot 10^{-8}$, $8,85 \cdot 10^{-9}$, $8,3 \cdot 10^{-9}$, $1,18 \cdot 10^{-8}$ A, respectivement. Ces données, ainsi que les ions pouvant correspondre à ces rapports m/z , sont présentés dans le tableau III-7.

Rapport m/z	Intensité maximale (A)	Intensité maximale relative	Ions correspondants
12	1,10E-07	4,6	C^+
14	9,83E-09	0,4	N^+
16	2,99E-07	12,5	O^+
17	3,72E-07	15,6	OH^+
18	1,53E-06	64	H_2O^+
20	6,20E-09	0,3	$H_2^{18}O^+$
22	9,80E-09	0,4	$^{12}C^{16}O_2^{++}$
28	4,17E-07	17,4	$^{12}C^{16}O^+$ $^{14}N_2^+$
29	5,14E-09	0,2	$^{13}C^{16}O^+$ $^{14}N^{15}N^+$
32	7,49E-08	3,1	O_2^+ S^+
40	5,78E-09	0,2	Ar^+
44	2,39E-06	100	CO_2^+
45	2,63E-08	1,1	$^{13}C^{16}O_2^+$
46	8,85E-09	0,4	$^{12}C^{16}O^{18}O^+$
48	8,30E-09	0,3	SO^+
64	1,18E-08	0,5	SO_2^+

Tableau III-7 : récapitulatif des rapports m/z observés au cours de cette analyse, intensité maximale absolue et relative, et ions pouvant correspondre aux rapports m/z observés

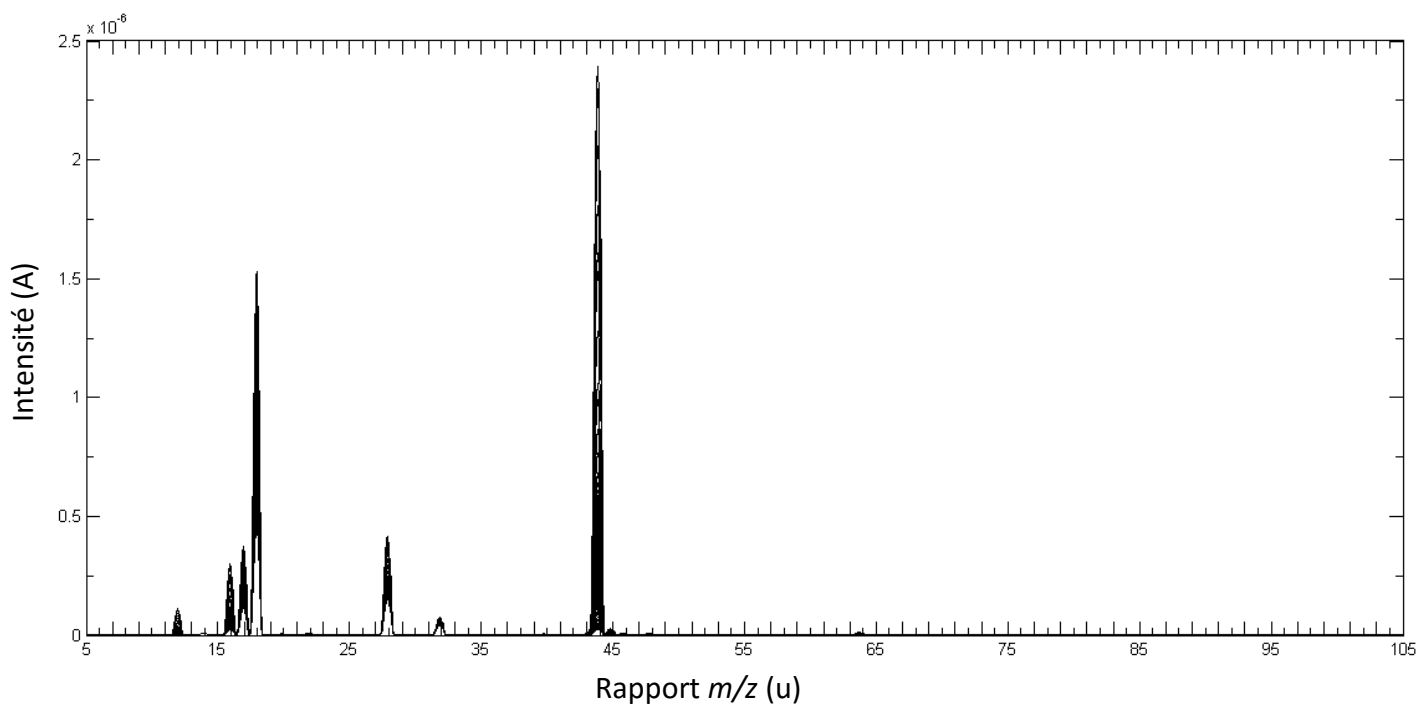


Figure III-41 : Représentation graphique du courant d'ions (A) en fonction du rapport m/z .

L'ensemble des valeurs d'intensité mesurées au cours du gradient de température est présent.

Nous allons maintenant représenter l'évolution de l'intensité de ces rapports m/z en fonction du gradient de température (figure III-42).

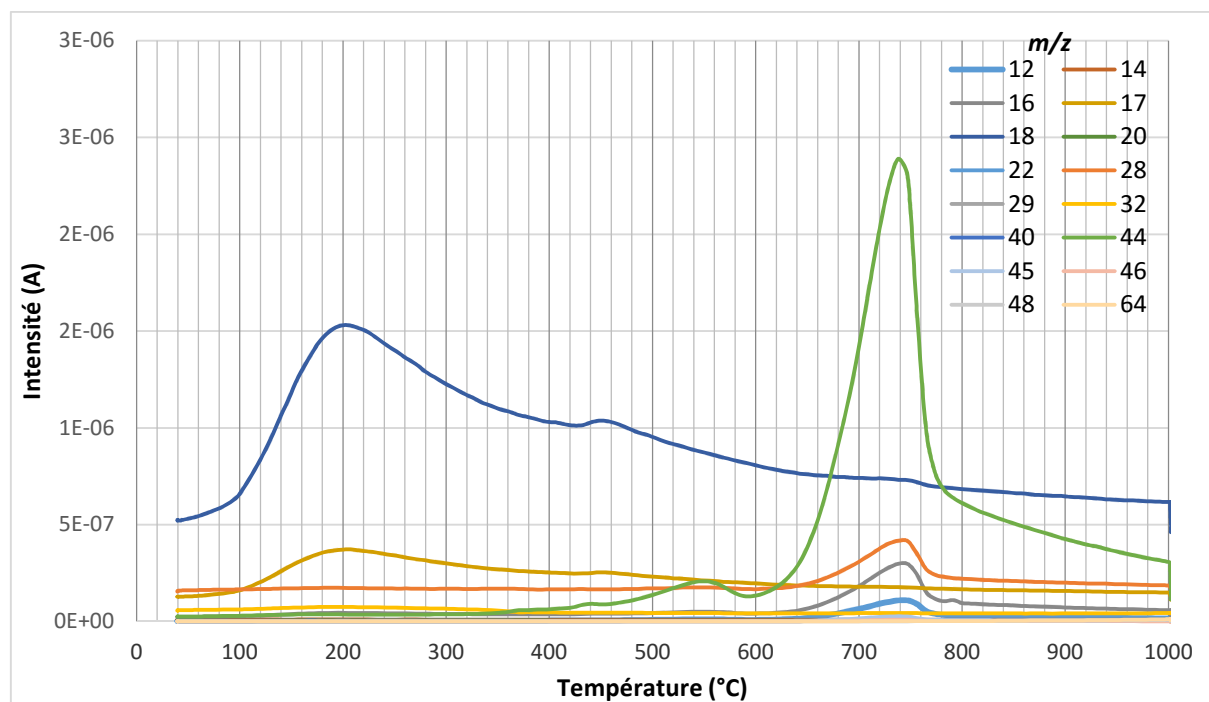
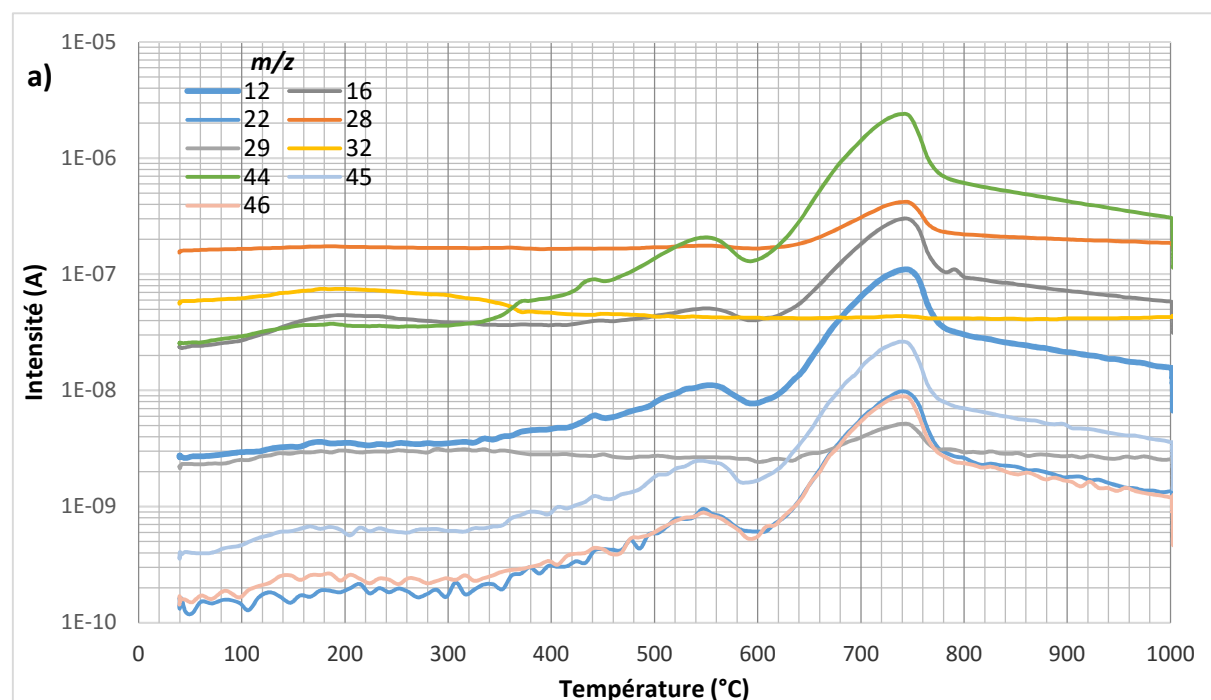


Figure III-42 : Intensité (A) en fonction de la température (°C) lors du chauffage de l'échantillon de sol de Svalbard

A première vue, on peut voir sur cette figure que la libération de gaz à partir de l'échantillon se déroule en quatre étapes principales: une première étape avec une intensité maximale à 205°C (caractérisée par la libération d'espèces de rapport m/z = 17 et 18). La deuxième étape possède une intensité maximale à 450°C (toujours caractérisée par les rapports m/z = 17 et 18). La troisième étape possède une intensité maximale à 547°C (caractérisée principalement par le rapport m/z = 44). La quatrième étape connaît une intensité maximale à 739°C (toujours caractérisée principalement par le rapport m/z = 44).

Deux étapes mineurs sont également observables : une à 442°C (rapport m/z = 44), et une à 791°C (rapport m/z = 16).

La lecture de cette figure étant limitée, nous pouvons observer de manière plus détaillée la libération des différents gaz grâce à la représentation des intensités sur une échelle logarithmique de base 10 (figure III-43). Les différentes courbes ont été réparties sur trois graphiques en fonction de la similarité de leurs profils d'évolution de l'intensité en fonction de la température.



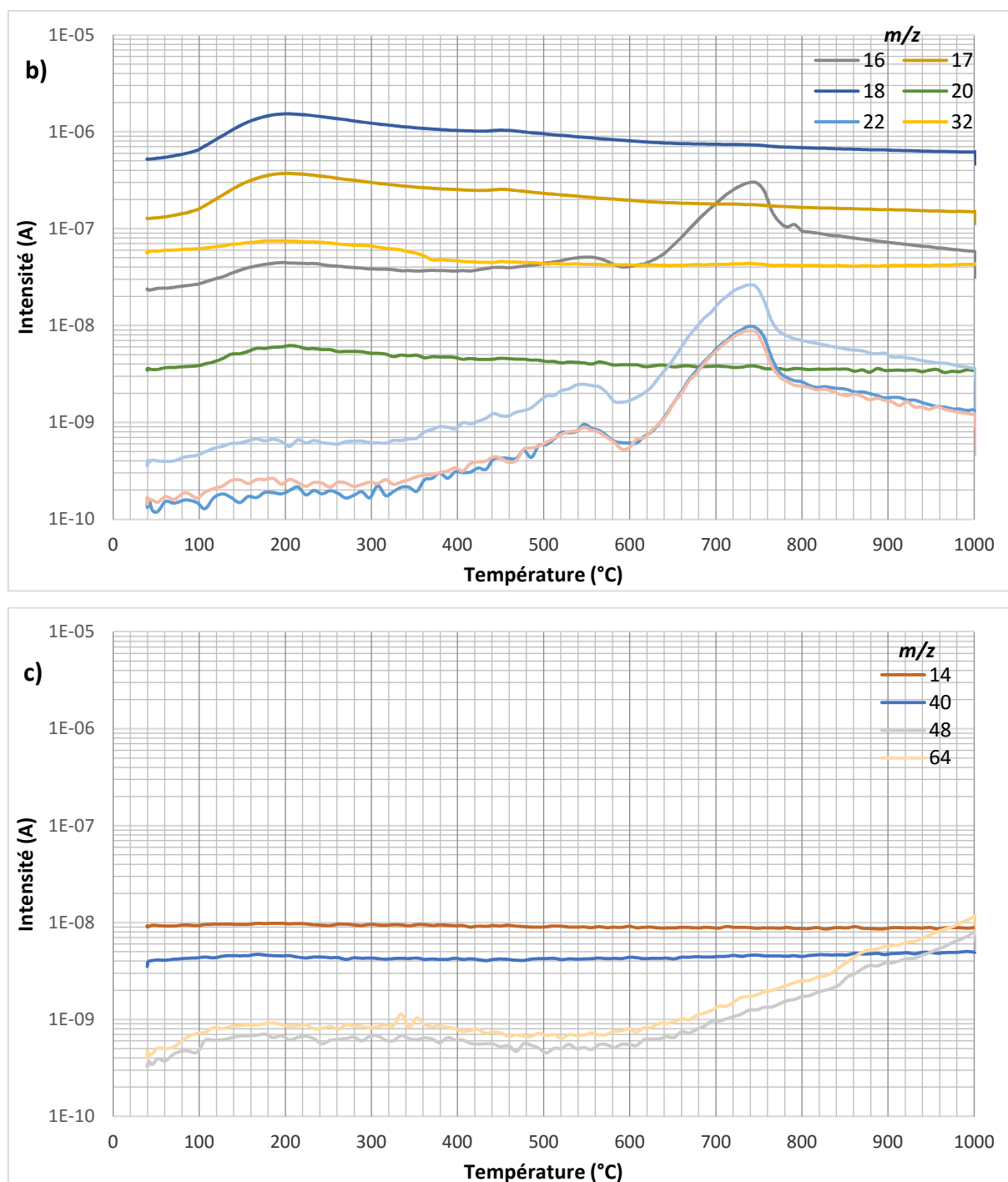


Figure III-43 : Représentation graphique de l'intensité (A) (échelle logarithmique) en fonction de la température (°C)

Grâce à la figure III-43, nous pouvons observer plus en détail les différents types de courbes :

- celles possédant un pic d'intensité à 739°C (m/z = 12, 16, 22, 28, 29, 32, 44, 45, 46). Elles possèdent également un pic à 547°C, sauf trois d'entre elles (m/z = 28, 29, 32).

Grâce à la courbe la plus intense (rapport $m/z = 44$), on peut voir que ce rapport m/z possède en fait deux plateaux et trois pics d'intensité : premier plateau atteint à environ 157°C, deuxième plateau atteint à environ 370°C, premier pic à 442°C, deuxième pic à 547°C, et troisième pic à 739°C. La courbe du rapport $m/z = 16$ possède également un pic d'intensité à 791°C (figure III-43.a)) ;

- celles possédant un pic d'intensité à 205°C ($m/z = 16, 17, 18, 20, 32$; voire $m/z = 45, 46, 22$). Quatre d'entre elles possèdent également les pics d'intensité à 547 et 739°C ($m/z = 16, 22, 45, 46$) (figure III-43.b)) ;

- et les courbes ne montrant pas de variation de comportement particulier ($m/z = 14, 40$), sauf celles montrant une augmentation graduelle de l'intensité à partir d'environ 600°C et jusqu'en fin d'analyse ($m/z = 48, 64$) (figure III-43.c)).

Nous disposons maintenant d'une vision plus précise des quatre étapes principales de la libération de gaz au cours du chauffage :

- première étape : libération d'une espèce ($m/z = 16, 17, 18$) avec intensité maximale atteinte à 205°C.

- deuxième étape : libération de la même espèce avec cette fois ci une intensité maximale à 450°C.

- troisième étape : libération d'une espèce qui semble différente ($m/z = 12, 16, 22, 44, 45, 46$) avec intensité maximale à 547°C.

- quatrième étape : libération de la même espèce, avec cette fois une contribution des rapports supplémentaires $m/z = 28, 29, 32$, et une intensité maximale à 739°C.

Nous allons maintenant procéder à l'identification de ces différentes espèces, en comparant les spectres de masse typiques (source : NIST web book) des principaux gaz attendus (O_2, CO_2, H_2O, SO_2) avec les intensités relatives des différents rapports m/z mesurés au cours de l'analyse.

Dioxygène:

On peut voir une libération d' O_2 en début d'analyse, provenant d'une première espèce, possédant un maximum à 195°C, avant de décroître et se stabiliser à partir de 370°C. Les pics

du rapport $m/z = 16$, à 547°C, 739°C, et 791°C, proviennent certainement d'une espèce différente.

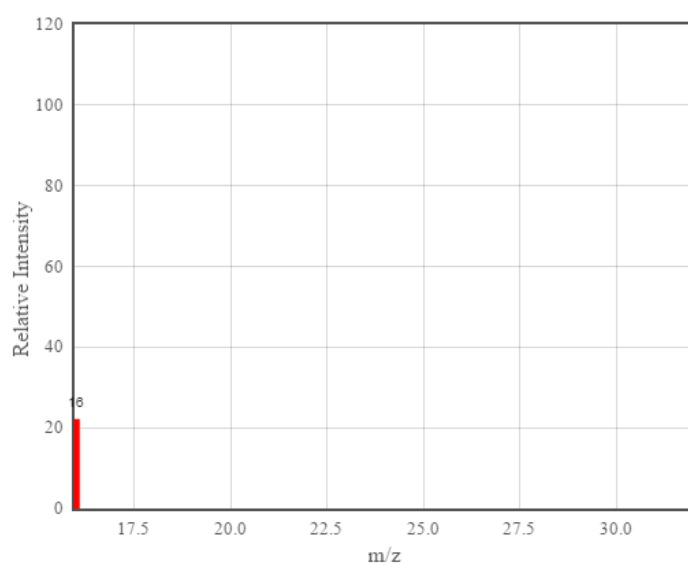
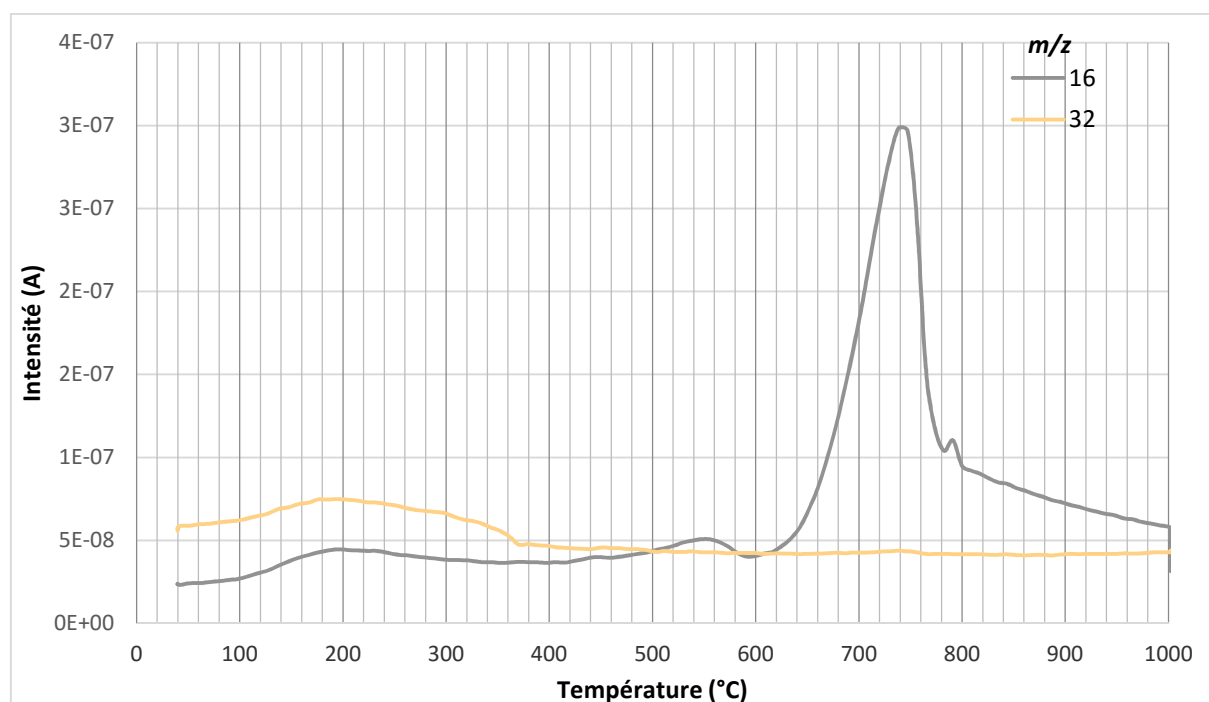


Figure III-44 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse de l' O_2 ; (b) spectre de masse typique de l' O_2

Dioxyde de carbone:

On peut voir une libération de CO_2 au cours du chauffage, qui se fait en plusieurs étapes : deux plateaux (157°C, 370°C) et trois pics (442°C, 547°C, et 739°C). Pour les deux

plateaux, cela est plus facilement observable sur la courbe du rapport $m/z = 44$ en figure III-43.a). Le premier pic (442°C) est plus facilement observable en enlevant la courbe $m/z = 44$ (figure III-45). Il semble également qu'une contribution d'une autre source pour le rapport $m/z = 28$ dissimule le pic à 547°C pour ce rapport m/z . Le pic à 791°C pour le rapport $m/z = 16$ doit provenir d'une autre substance. La figure III-46 permet également d'observer la détection de CO_2 en début d'analyse.

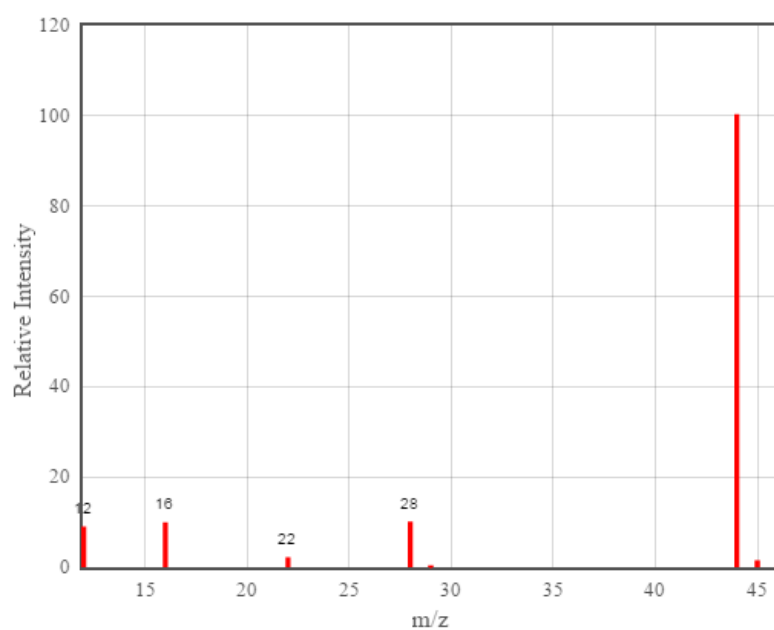
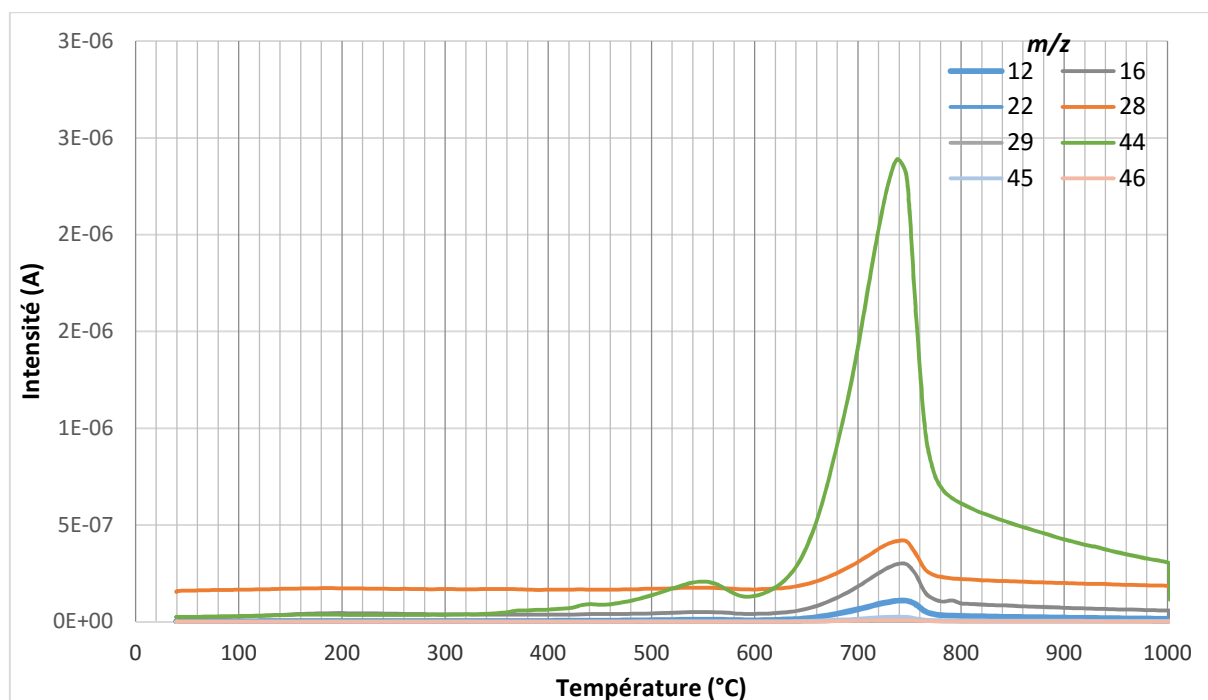


Figure III-45 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du CO_2 ; (b) spectre de masse typique du CO_2

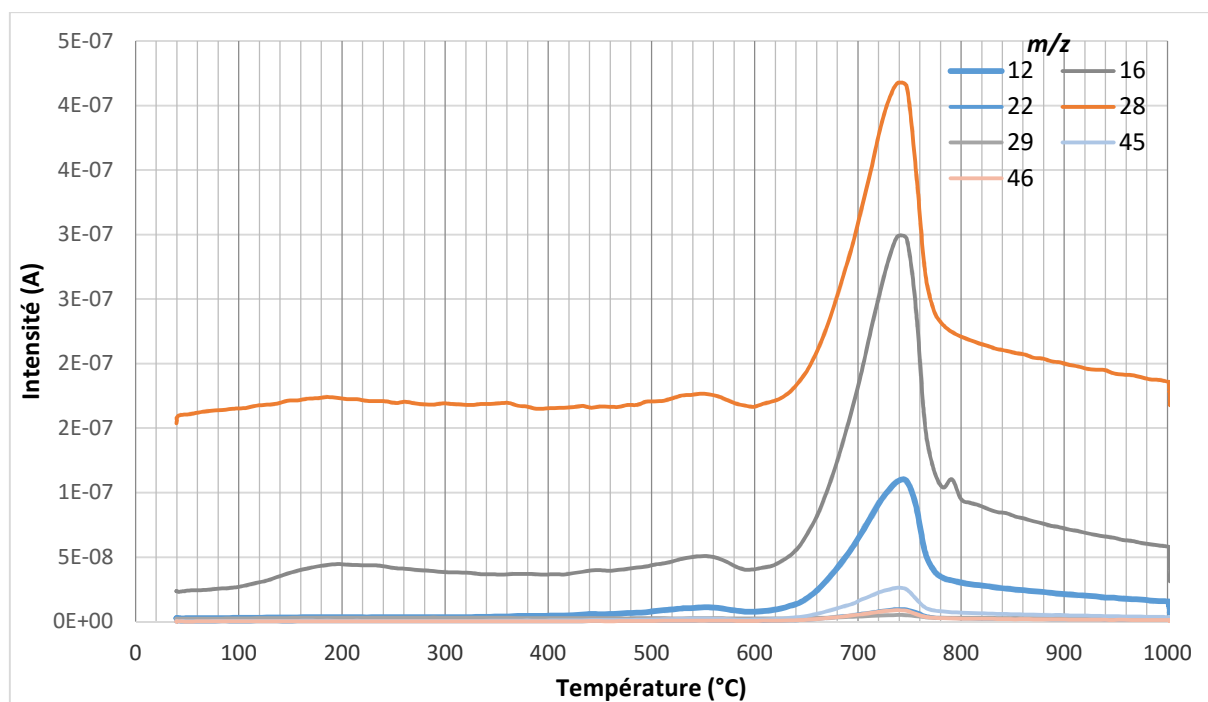


Figure III-46 : rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du CO_2 (sans le rapport $m/z = 44$).

Eau:

La libération d'eau se fait principalement en 3 étapes : à 205°C, 450°C et 739°C. Cette dernière étape est simultanée avec celle de la libération de CO_2 . Les pics du rapport $m/z = 16$ à 442°C, 547°C, et 739°C sont causés par la libération de CO_2 .

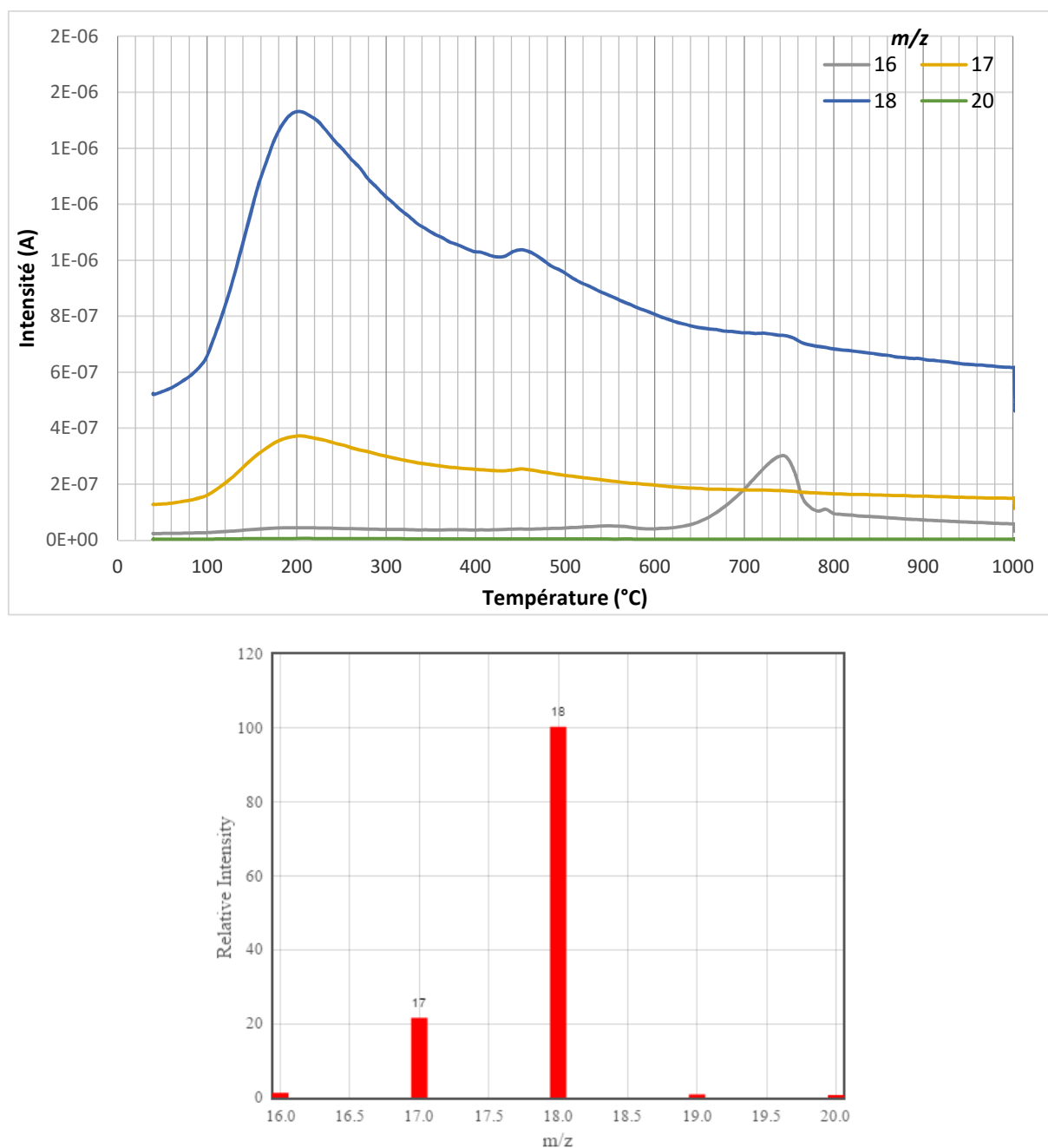


Figure III-47 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse de H_2O ; (b) spectre de masse typique de H_2O

Dioxyde de soufre:

A priori, aucun SO_2 n'est libéré au cours de l'analyse (absence du pic majoritaire à $m/z = 64$). Cependant, une faible libération en fin d'analyse ne peut être éliminée, mais est possiblement causée par un autre phénomène, puisque le soufre n'a pas été détecté dans le sol de Svalbard par analyse élémentaire.

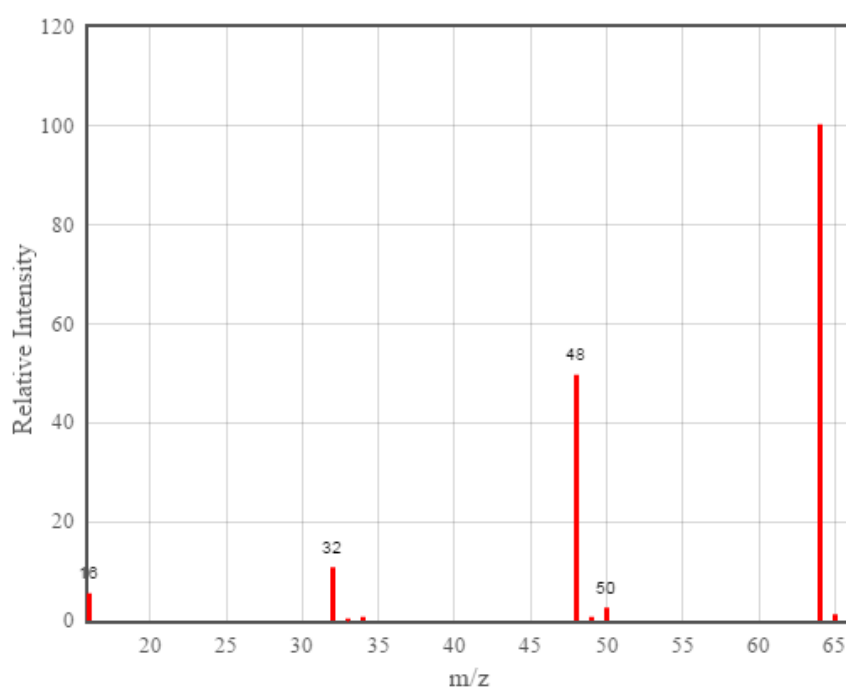
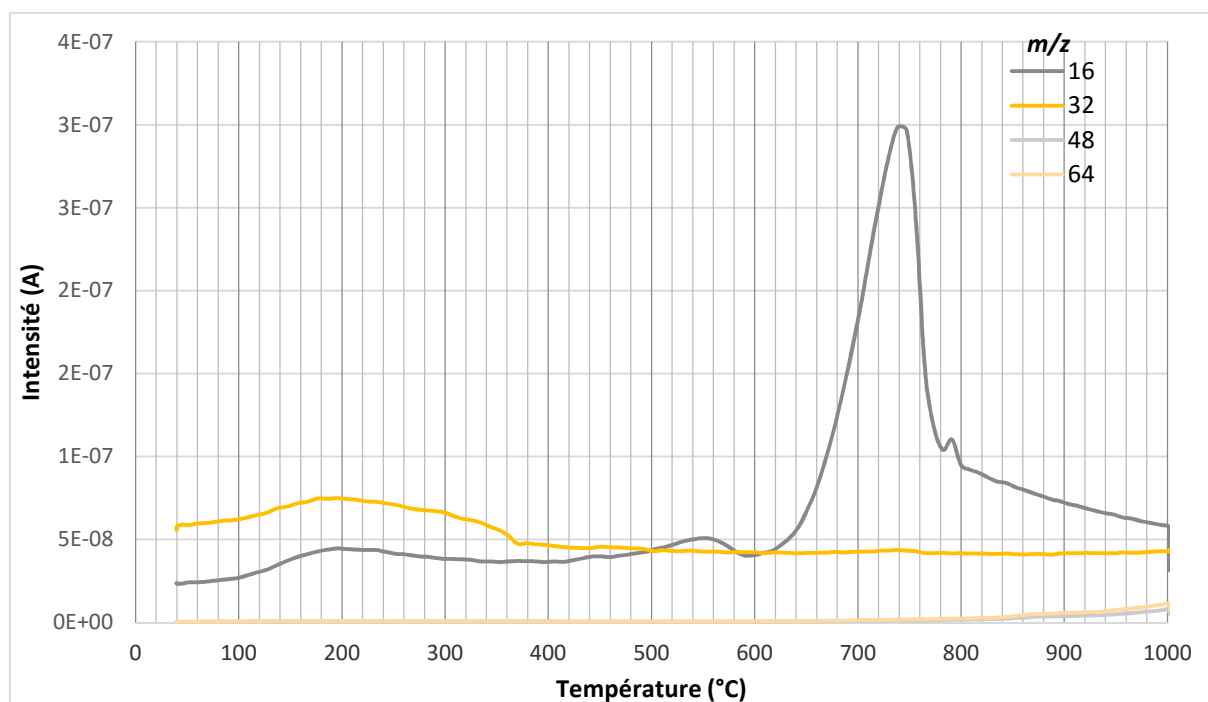


Figure III-48 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du SO_2 ; (b) spectre de masse typique du SO_2

Pour résumer, la première étape principale correspond sûrement à une libération d'eau, avec une intensité maximale à 205°C. La deuxième étape principale (intensité maximale à 450°C) correspond également à une libération d'eau. On peut également voir une libération de CO_2 avec des étapes mineures à 370°C et 442°C. La troisième étape (intensité maximale à

547°C) correspond encore à une libération de CO₂. La quatrième étape principale (739°C) est encore une fois caractérisée par la libération de CO₂, mais aussi, semble-t-il, une libération simultanée de H₂O. Une autre étape mineure (791°C) voit la libération d'une espèce caractérisée uniquement par le rapport $m/z = 16$, et donc non indentifiable.

Nous allons maintenant poursuivre notre interprétation grâce à la corrélation des données de spectrométrie de masse avec celles obtenues par TG et DSC.

*Etude des données TG et DSC, et corrélation avec les données
obtenues par MS*

La TG-DSC-MS sur l'échantillon de sol de Svalbard nous permet de représenter la masse (en % de la masse initiale) et la dérivée de la masse par rapport au temps (en $\%.min^{-1}$), qui permet de repérer les pertes de masse sous forme de pics (figure III-49).

Les pertes de masse les plus rapides sont observées aux températures de 110°C, 432°C, 532°C, et 733°C. La perte de masse la plus importante (et également la plus rapide) est celle dont la vitesse maximale (sommet du pic dTG) est à 733°C. Comme pour Atacama, seulement 5% de la masse totale est perdue.

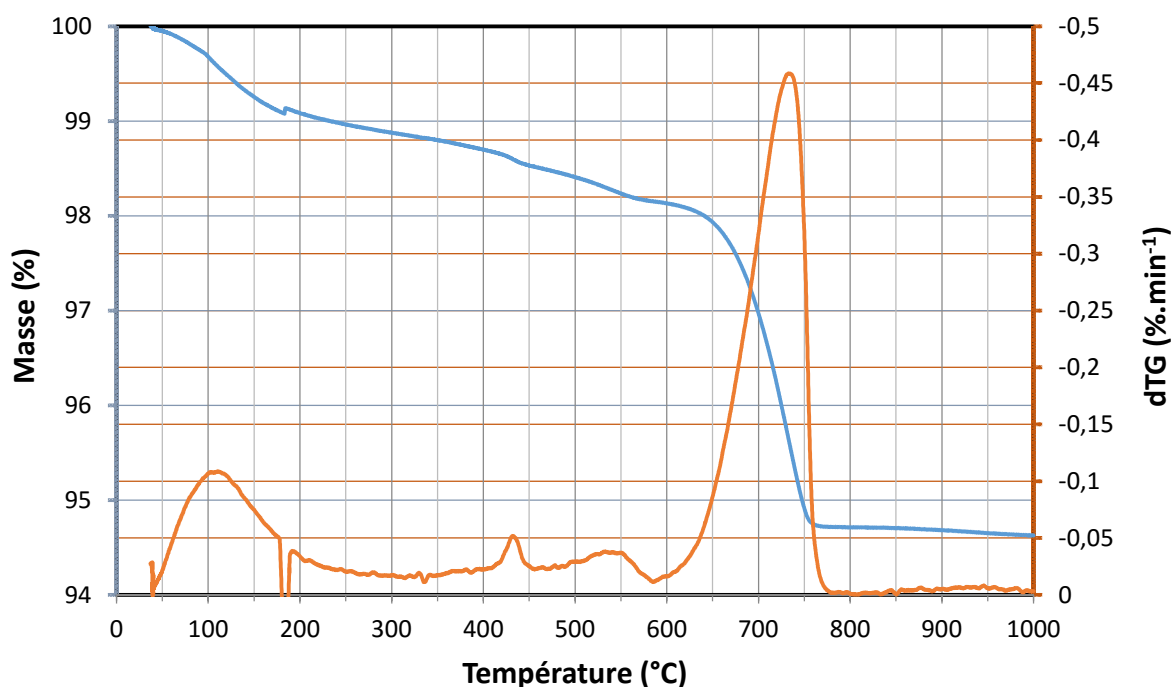


Figure III-49: courbes de TG (a) et dTG (b) pour Svalbard. Chauffage à $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium. L'artefact (cassure) aux alentours de 180°C pourrait être dû à un accident lors de l'analyse (par exemple un heurt de l'appareil ou de la table sur laquelle il repose).

Comparons maintenant au sein de la même figure les courbes d'intensité des rapports m/z , et celle de la dTG ; en fonction de la température, sur une échelle normale (figure III-50) et sur une échelle logarithmique de base 10 (figure III-51).

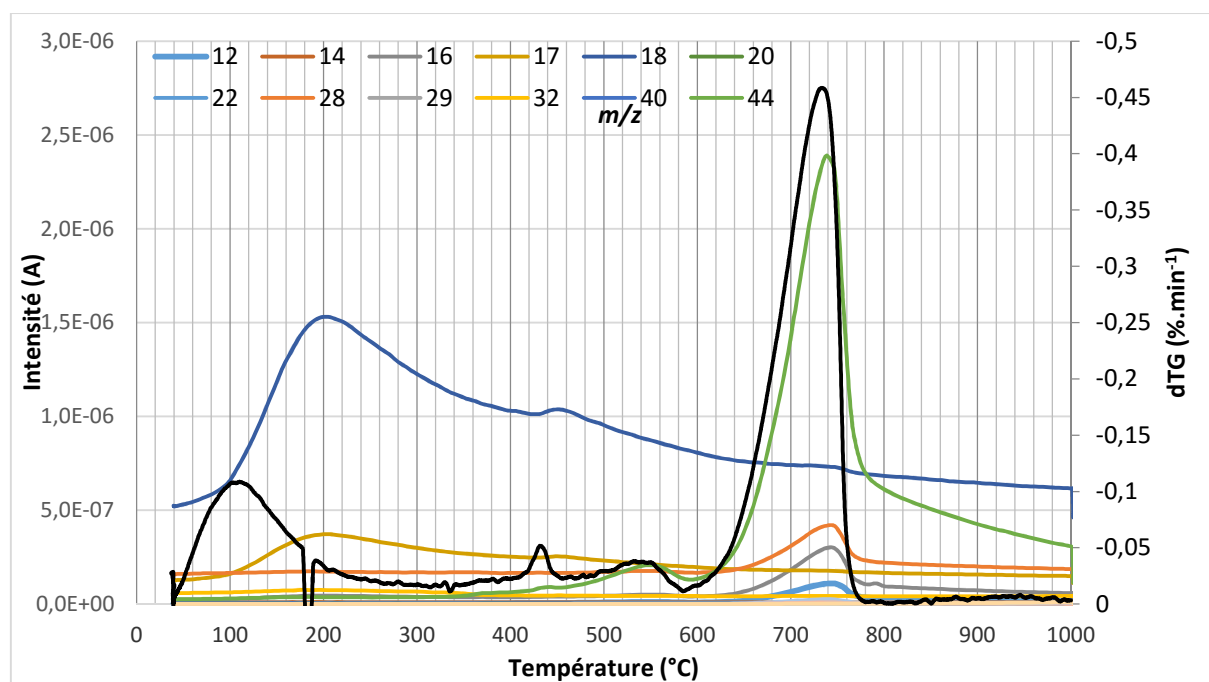


Figure III-50: courbes d'intensité des rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et courbe dTG ; en fonction de la température.

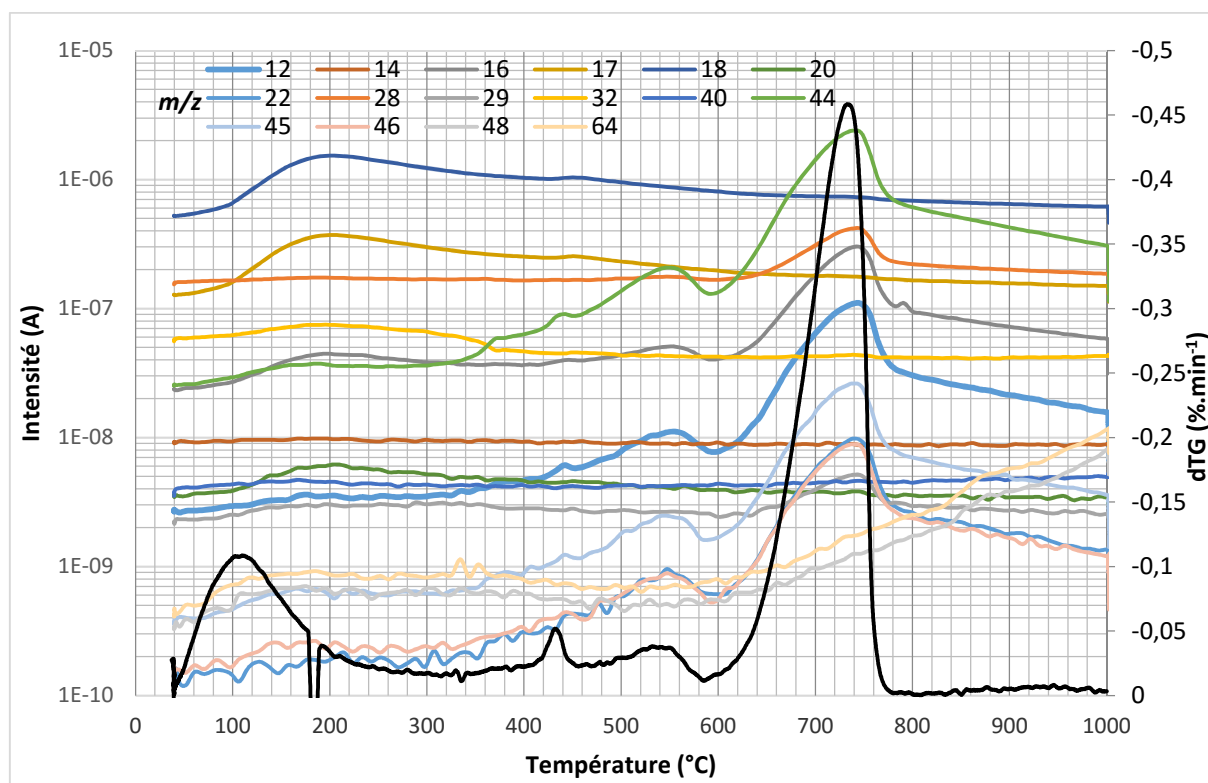


Figure III-51: courbes d'intensité des rapports m/z détectés au cours de l'analyse (échelle logarithmique), et courbe dTG ; en fonction de la température.

Nous pouvons maintenant corréler les quatre principales étapes de perte de masse (110°C, 432°C, 532°C, et 733°C) avec les intensités des espèces relâchées au cours du chauffage.

La première étape de perte de masse, commençant en début d'analyse, culminant à 110°C, et se terminant environ à 250°C, semble correspondre à la libération d'eau non structurale, mais elle précède largement la détection de l'eau par le spectromètre de masse (maximum à 205°C). Le même phénomène avait été observé pour l'échantillon d'Atacama. Nous proposerons en fin de ce paragraphe une explication à ce phénomène.

La deuxième étape (432°C) correspond (bien qu'elle précède légèrement) la détection de CO_2 à 442°C.

La troisième étape (532°C) correspond également à une libération de CO_2 (mesurée à 547°C par le spectromètre de masse).

La quatrième étape (733°C), la plus rapide, mais aussi la plus importante quantitativement, correspond à une nouvelle libération de CO_2 (739°C).

Les deux plateaux de libération de CO_2 (157°C, 370°C), et les libérations d'eau à 450°C et 739°C, ne sont pas liées à des pertes de masse.

Concernant le phénomène du décalage évoqué plus avant, on peut, de manière générale au cours de l'analyse, observer un délai entre la détection de perte de masse par la TG et la détection de l'espèce libérée par le spectromètre de masse. On peut également remarquer que plus la température est élevée, plus ce délai est réduit, au point d'être réduit à seulement 3°C de différence pour la quatrième étape de perte de masse (739 – 733°C), contre 95°C (205 – 110°C) en début d'analyse. L'explication pourrait résider dans le fait que lors de la libération d'une espèce sous l'effet du chauffage, une perte de masse est enregistrée instantanément par la microbalance. Cependant, l'espèce libérée doit être évacuée du four par le gaz inerte, et passer par la ligne de transfert entre le TG-DSC et le spectromètre de masse, avant de pouvoir être détectée par le spectromètre de masse. Ce phénomène serait responsable du délai observé entre les deux types de mesures (perte de masse et détection par SM de l'espèce libérée). Le fait que ce délai soit raccourci au fur et à mesure de l'analyse serait causé par l'augmentation graduelle de la température. En effet, avec l'augmentation de la température, les particules libérées du sol et entraînées par le gaz porteur possèdent une vitesse plus importante, et sont donc réparties dans un volume plus important du gaz porteur, parvenant ainsi au spectromètre de masse plus rapidement qu'à une température plus faible (Lu, communication personnelle).

Pour résumer, nous pouvons observer au cours du chauffage de ce sol une libération d'eau en début d'analyse (intensité maximale à 205°C) (correspondant approximativement à une étape de perte de masse), ainsi qu'une autre à 450°C (probablement associée à la perte de masse à 432°C). On peut également voir de multiples libérations de CO_2 entre 157°C et 547°C (dont deux correspondent à des pertes de masse), et pour finir une libération simultanée de CO_2 et de H_2O à 739°C (perte de masse rapide et importante), la plus grande partie de cette perte de masse pouvant être attribué à la libération de CO_2 .

Le thermogramme DSC est comparé à la courbe TG dans la figure III-52. On peut y voir, comme lors de l'analyse d'Atacama, un premier pic anormalement intense, qui correspond probablement à un artefact causé par le temps nécessaire à l'appareil pour se stabiliser, comme expliqué plus en détail au paragraphe portant sur l'analyse de l'échantillon de sol

d'Atacama (Lu, communication personnelle). Ce dernier rend ininterprétable la nature des deux premières réactions principales.

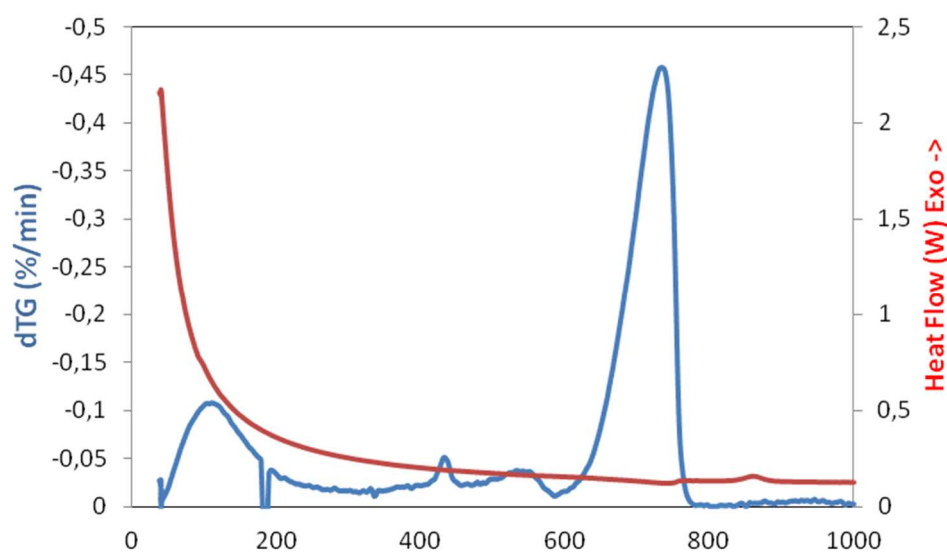


Figure III-52: courbes de dTG et DSC pour Svalbard. Chauffage à $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium

Cependant, en zoomant sur la partie de la courbe concernant les deux dernières pertes de masse (figure III-53), on peut identifier la nature de la quatrième étape de perte de masse. Cette dernière, de nature endothermique, confirme la décarbonatation d'un minéral, conduisant à la libération de CO_2 . A 868°C , une réaction exothermique prend place. Elle pourrait s'expliquer par la transformation d'un minéral ou à une transition de phase non associée avec un changement de masse.

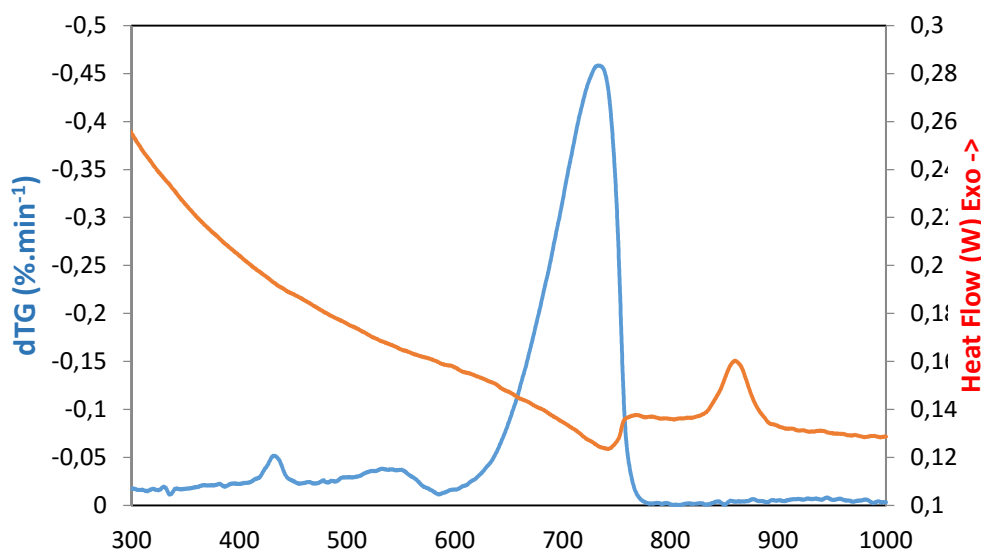


Figure III-53 : courbes de dTG et DSC pour Svalbard (zoom sur une partie de la courbe). Chauffage à $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium

Pour résumer et poursuivre l'interprétation, on peut observer :

(i.a) une détection d' O_2 , commençant en début d'analyse, avec un maximum à 195°C , décroissant jusqu'à 370°C , puis restant stable jusqu'en fin d'analyse. La libération jusqu'à 370°C pourrait être causée par la vaporisation de H_2O_2 . Le rapport $m/z = 32$ ne peut pas être attribué au soufre, puisque nous n'avons pas détecté de sulfates lors de l'analyse.

Ce dioxygène n'est probablement pas libéré par des perchlorates, puisque nous aurions observé la libération de Cl ($m/z 35$). Il n'est probablement pas libéré non plus par des oxydes métalliques, puisque ces derniers se décomposent à des températures plus importantes.

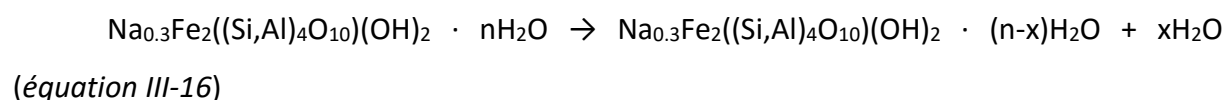
La stabilité de la libération d' O_2 à partir de 370°C jusqu'en fin d'analyse pourrait s'expliquer par une fuite d'air constante au cours de l'analyse. De plus, le rapport $m/z 28$ est plus important que $m/z 44$, et d'intensité stable, en début d'analyse (jusqu'aux premières étapes de libération de CO_2), ce qui confirmerait plus avant l'hypothèse de la fuite d'air.

Alternativement, le rapport $m/z 28$ pourrait être causé par la production importante de CO par décarboxylation de molécules organiques. En effet, Eigenbrode *et al.* (2014) ont montré que le CO pouvait être le produit volatil principal libéré par la décarboxylation de molécules organiques.

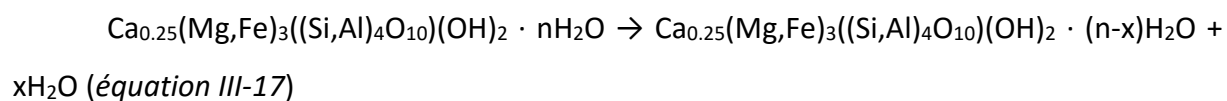
(i.b) une libération d'eau, culminant à 205°C, correspondant probablement à la première étape de perte de masse commençant en début d'analyse, culminant à 110°C, et se terminant vers 250°C. Ce type de réaction est caractéristique de la déshydratation de l'eau sorbée provenant d'un échantillon contenant une quantité significative de smectite (> 20%) (Karathanasis, 2008), ce qui confirme la présence de ce type de minéral dans l'échantillon de Svalbard (qui est en effet majoritairement constitué de smectite). Les dernières étapes de cette réaction de déshydratation peuvent inclure la perte d'eau de coordination liée aux cations saturants (eau inter-feuillets) ou associée à la surface de la smectite (eau de solvation) (Karathanasis, 2008).

Nous pouvons proposer les équations de déshydratation de deux smectites, la nontronite et la saponite :

Nontronite



Saponite

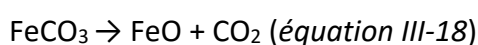


(ii) une libération graduelle de CO₂ commençant en début d'analyse, avec deux plateaux atteints à 157°C puis 370°C, non liée à une étape de perte de masse. Il est peu probable que ce CO₂ provienne de la décarbonatation de carbonates. En effet, les réactions de décarbonatation se déroulent habituellement à des températures bien plus élevées. La décarbonatation des carbonates commence habituellement entre 450°C (sidérite, gamme 450 – 600°C) et 750°C (calcite, gamme 750 – 900°C) (Karathanasis, 2008).

Il est cependant possible que cette détection de CO₂ soit causée par d'autres facteurs, tels que : la décarboxylation de molécules organiques présentes dans l'échantillon ; leur combustion sous l'effet de l'O₂ (la dégradation de carbonates réagissant avec du HCl provenant de composés oxychlorés pouvant être écartée puisque nous n'en avons pas détecté). Les détails de cette interprétation sont donnés dans la partie portant sur l'échantillon d'Atacama (étape (ii)).

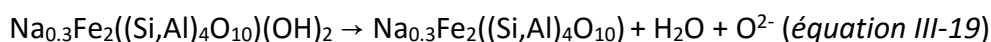
(iii) une libération de CO₂ à 442°C, liée à une perte de masse (vitesse maximale à 432°C). Cette libération pourrait provenir de la décarbonatation d'un carbonate tel que la sidérite (gamme de température 450 - 600 °C). En effet, des traces de carbonates ont été détectées dans l'échantillon de Svalbard analysé. Cependant, le carbonate détecté à l'état de traces est la magnésite (gamme de température de décarbonatation 500 – 750°C). Ainsi, soit de la sidérite est présente dans l'échantillon, soit la décarbonatation de la magnésite (*équation III-10*) est plus précoce qu'en théorie, soit cette libération de CO₂ provient à nouveau de la décarboxylation de molécules organiques ou de leur combustion.

Décarbonatation de la sidérite :



(iv) une nouvelle libération d'eau à 450°C, qui pourrait aussi être liée à la perte de masse à 432°C. Cela pourrait provenir de la déshydroxylation de la smectite présente dans l'échantillon. Les trois membres les plus communs du groupe des smectites sont la montmorillonite $(\text{Na,Ca})_{0.33}(\text{Al,Mg})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$; la nontronite $\text{Na}_{0.3}\text{Fe}_2((\text{Si,Al})_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$; et la saponite $\text{Ca}_{0.25}(\text{Mg,Fe})_3((\text{Si,Al})_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Les smectites de magnésium se déshydroxylent dans la gamme 600 – 900°C (Karathanasis, 2008), nous pouvons donc exclure pour cette étape la montmorillonite et la saponite, ce qui nous laisse la nontronite. Et en effet, la nontronite se déshydroxyle dans la gamme 357 – 457°C (Felix and Girgis, 1989).

Cette libération d'eau à 450°C pourrait donc provenir de la déshydroxylation de nontronite (déshydratée). Nous pouvons proposer la réaction suivante :



(v) une libération de CO₂ à 547°C, puis une autre, plus importante, à 739°C, liées à des pertes de masse à 532°C et 733°C, respectivement.

La première pourrait correspondre à la décarbonatation d'un carbonate comme la dolomite (500 – 950°C) (*équations III-8, III-9*), la magnésite (500 – 750°C) (*équation III-10*), la sidérite (450 – 600°C) (*équation III-18*), ou le carbonate de sodium Na₂CO₃ (500 – 1000°C) (*équation III-11*). Et en effet, de la magnésite est présente dans l'échantillon (sous forme de traces).

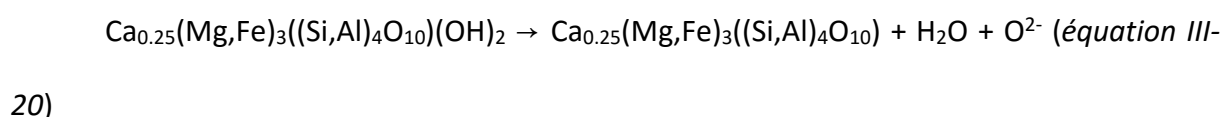
La réaction à 739°C est endothermique et pourrait correspondre à la décarbonatation d'un autre carbonate, tel que la calcite (750 – 900°C) (*équation III-9*), ou bien la dolomite, la magnésite, ou Na_2CO_3 (si ces derniers n'ont pas subi leur décarbonatation lors de la première libération de CO_2).

Ces deux libérations de CO_2 pourraient donc provenir de deux carbonates différents. Il est également possible que la première libération soit causée par la décarbonatation de la dolomite, produisant de la calcite qui serait ensuite décarbonatée, expliquant la deuxième libération de CO_2 .

Alternativement, il est possible que ces pics soient causés par la décarboxylation de molécules organiques ; voire leur combustion (sous l'effet de la présence d' O_2). Par exemple, il a été montré que sous atmosphère d' O_2 , les acides benzène et naphthalène carboxyliques peuvent libérer du CO_2 entre 275 et 1050°C (Eigenbrode *et al.*, 2014).

(vi) une libération d'eau à 739°C, pouvant participer à la perte de masse à 733°C. Elle pourrait provenir de la déshydroxylation d'une smectite telle qu'une smectite de magnésium (600 – 900°C) (comme la montmorillonite ou la saponite), ou d'hectorite (une smectite dioctaédrique) (*équation III-6*) (500 – 900°C).

Nous pouvons proposer une équation pour la déshydroxylation de la saponite déshydratée :



(vii) et enfin, une réaction exothermique à 868°C, non associée à un changement de masse. Nous pouvons probablement exclure la recristallisation d'une phase minérale dioctaédrique déshydroxylée, telle que la montmorillonite (smectite de magnésium) en minéral de type spinel (MgAl_2O_4), car la température habituelle de cette réaction se situe entre 900°C et 1000°C (Karathanasis, 2008).

Des minéraux trioctaédriques, tels que la serpentine, le talc, la saponite, la vermiculite et la chlorite peuvent également produire un exotherme similaire entre 700°C et 1100°C, associé avec la formation de forstérite (Mg_2SiO_4) ou d'enstatite (MgSiO_3) (Karathanasis, 2008).

Parmi ces derniers, seule la saponite est une smectite (or, le principal minéral constituant l'échantillon de Svalbard est une smectite).

Le minéral responsable de cet exotherme à 868°C est donc probablement la saponite, confirmant ainsi la responsabilité de ce minéral dans la libération d'eau à 739°C (étape (vi)).

Le mécanisme de la recristallisation de la saponite en enstatite se déroule de manière similaire à celui de la dégradation du talc. La réaction se déroule via la migration de protons vers des zones de réaction. Le produit de réaction est principalement l'enstatite, accompagné de SiO₂ amorphe et d'Al₂O₃ (Wilson, 2013).

L'analyse TG-DSC-MS sur Svalbard a donc permis de confirmer la présence de smectite(s) dans l'échantillon, et d'en préciser l'identification, ces smectites étant probablement la nontronite et la saponite.

Cependant, l'ampleur de la perte de masse à 739°C, et l'intensité des pics correspondant au spectre de masse du CO₂ indiquent que les carbonates sont présents en plus grande quantité qu'à l'état de traces dans l'échantillon. Alternativement, la libération de CO₂ peut être causée par la combustion de molécules organiques (présence d'O₂) ou leur décarboxylation. A 739°C, la décarbonatation d'un carbonate et la déshydroxylation de la saponite prennent place simultanément.

Pour résumer (tableau III-8), au cours de l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol de Svalbard (AM11-155), nous pouvons observer une libération de dioxygène du début de l'analyse jusqu'à 370°C, possiblement liée à la vaporisation de H₂O₂.

Un premier pic de libération d'eau à 205°C (débutant en début d'analyse, correspondant à la première étape de perte de masse) peut correspondre à la perte d'eau de porosité du sol, ainsi qu'à la déshydratation de la smectite présente dans l'échantillon, par perte de son eau adsorbée, eau inter-feuillet, et eau de solvation.

Une libération graduelle de CO₂ commence en début d'analyse, avec deux plateaux à 157°C et 370°C, correspondant probablement à la combustion de molécules organiques sous effet de l'O₂, ou décarboxylation de ces mêmes molécules organiques.

Un pic de libération de CO₂ est observé à 442°C (perte de masse à 432°C), causé par la décarboxylation de sidérite, de magnésite, ou provenant de la combustion / décarboxylation de molécules organiques.

Une nouvelle libération d'eau à 450°C (perte de masse à 432°C) provient probablement de la déshydroxylation de nontronite, confirmant ainsi la présence d'au moins un type de smectite dans l'échantillon.

Une libération de CO₂ est observée à 547°C (perte de masse à 532°C), puis à 739°C (perte de masse à 733°C). Ces deux libérations pourraient s'expliquer par la décarbonatation de deux carbonates différents, notamment la magnésite (présente à l'état de traces dans l'échantillon), le carbonate de sodium, la sidérite (seulement pour la première libération), ou la calcite (seulement pour la deuxième libération). La dolomite seule pourrait expliquer ces deux libérations (décarbonatation avec production de calcite pour la première, et décarbonatation de la calcite pour la deuxième). Ces deux libérations de CO₂ pourraient aussi s'expliquer par la décarboxylation de molécules organiques ; voire leur combustion (présence d'O₂).

Une nouvelle libération d'eau est observée à 739°C (perte de masse à 733°C), provenant possiblement de la déshydroxylation de saponite.

La dernière étape est réaction exothermique (868°C), sans perte de masse, et correspond possiblement à la recristallisation de la saponite déshydroxylée (à 739°C) en forstérite ou enstatite.

Étapes de libération	Températures de libération	Espèce(s) libérée(s)	Perte(s) de masse (pics DTG)	Phénomène(s)
(i.a)	gamme 50 - 370°C	O ₂	N/A	Vaporisation de H ₂ O ₂
(i.b)	205°C	H ₂ O	110°C	Libération d'eau de porosité; libération d'eau inter-feuillets de nontronite et de saponite (éq.III-16, éq.III-17), d'eau adsorbée, d'eau de solvation
(ii)	plateaux à 157°C puis 370°C	CO ₂	N/A	Décarboxylation (e.g., éq.III-3) ou combustion de molécules organiques
(iii)	442°C	CO ₂	432°C	Décarbonatation précoce de magnésite (éq.III-10), décarbonatation de sidérite (éq.III-18), décarboxylation ou combustion de molécules organiques
(iv)	450°C	H ₂ O	432°C	Déshydroxylation de nontronite déshydratée (éq.III-19)
(v)	547°C	CO ₂	532°C	Décarbonatation de magnésite (éq.III-10) ou d'un autre carbonate (dolomite, sidérite, carbonate de sodium); décarboxylation ou combustion de molécules organiques
	739°C		733°C	Décarbonatation de magnésite ou d'un autre carbonate (dolomite, calcite, carbonate de sodium); décarboxylation ou combustion de molécules organiques
(vi)	739°C	H ₂ O	733°C	Déshydroxylation de saponite déshydratée (éq.III-20)
(vii)	868°C	N/A	N/A	Recristallisation de saponite en forstérite ou enstatite

Tableau III-8 : résumé des étapes de libération d'espèces au cours de l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol de Svalbard

3.4.2.3.3) Rio Tinto

Etude de l'évolution de l'intensité des fragments détectés, en fonction du gradient de température

Première analyse

Notre échantillon de sol de Rio Tinto est constitué de sulfates hydratés. La composition minéralogique exacte de l'échantillon est la suivante (Stalport *et al.*, 2012) :

Jarosite (36,2%) : $\text{KFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$

Copiapite (11,6%) : $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_4^{3+}(\text{SO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 20\text{H}_2\text{O}$

Alunogène (40,1%) : $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$

Amarantite (12,0%) : $\text{Fe}_2^{3+}(\text{SO}_4)_2\text{O} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Pour l'analyse TG-DSC-MS, la masse utilisée est de 72,71 mg. Le matériau de référence est Al_2O_3 , de masse 66,893 mg. Le gaz inerte est de l'argon. Le programme de température est constitué d'une rampe de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, avec une température initiale de 20°C , jusqu'à 1000°C .

La figure III-54 est la représentation en trois dimensions d'un scan TG-DSC-MS de Rio Tinto.

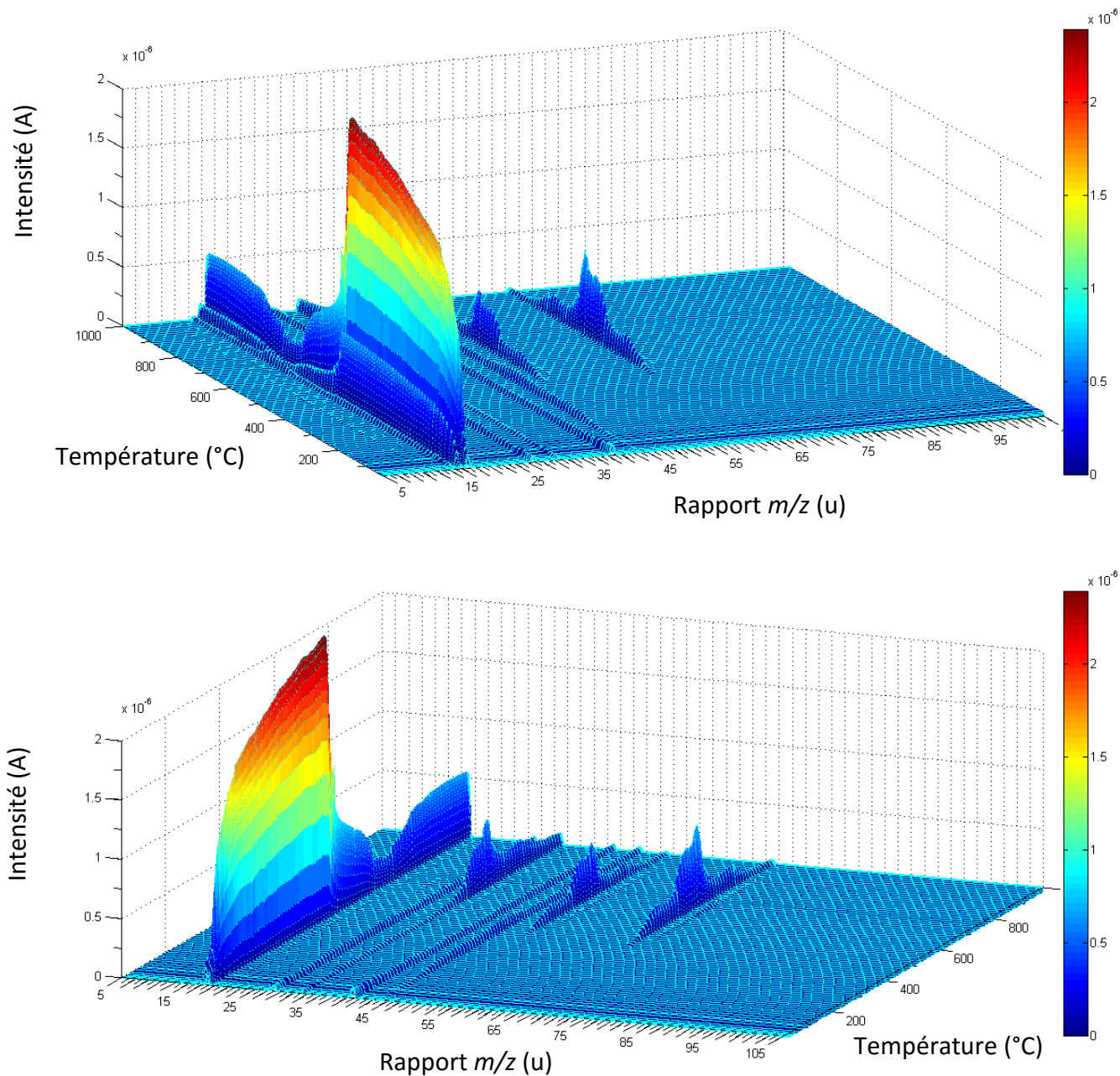


Figure III-54: Représentations graphiques (montrant la même figure sous deux angles différents) d'une analyse TG-DSC-MS sur un échantillon de sol de Rio Tinto. Chauffage à $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'argon.

Nous ne nous attarderons pas sur cette analyse, puisque l'analyse suivante nous permet d'aller plus dans les détails, cependant nous pouvons à première vue observer plusieurs phénomènes :

- Une espèce ayant pour rapport m/z 40 est libérée avec une intensité constante du début à la fin de l'analyse, ce qui pourrait correspondre au gaz inerte utilisé pour l'analyse (argon).
- Une espèce ayant pour rapport m/z 44 apparaît en cours d'analyse (environ 200°C) et reste constante jusqu'à la fin, ce qui pourrait être du CO₂.
- Trois espèces de m/z 32, 48 et 64 voient leur intensité augmenter à partir d'environ 500°C. Une quatrième espèce (m/z = 66) espèce fait une apparition ponctuelle lorsque les trois autres voient leur intensité atteindre leur maximum (à environ 700°C). Le pic des trois espèces précédemment décrites semble au moins quadruple. Ceci pourrait correspondre à libération de SO₂.
- Une espèce de m/z = 18 est présente en début d'analyse, son intensité augmente à partir d'environ 50°C, accompagnée de l'apparition d'autres espèces à m/z = 16 et 17, son intensité maximale est atteinte à environ 550°C, puis elle décroît rapidement, avant de d'augmenter à nouveau en fin d'analyse. Ceci pourrait correspondre à une libération d'eau.

Deuxième analyse (MID)

Nous avons ensuite réalisé une nouvelle analyse TG-DSC-MS, mais en utilisant cette fois le spectromètre de masse en mode « Multiple Ion Detection » (MID). Plutôt que de mesurer l'intensité d'une gamme entière de rapports m/z , seuls certains sont choisis, et mesurés individuellement au cours du gradient de température.

La masse de sol de Rio Tinto utilisée est de 72,72 mg. Le matériau de référence est Al₂O₃, de masse 66,893 mg. Le gaz inerte est de l'hélium. Le programme de température est constitué d'une rampe de 10°C.min⁻¹, avec une température initiale de 20°C, jusqu'à 1000°C.

L'ensemble des rapports m/z sélectionnés pour cette analyse sont représentés en figure III-55. Parmi ces rapports, les plus abondants au cours du gradient de température sont les suivants : 16, 17, 18, 28, 32, 44, 48, 64 et 66, avec des intensités maximales de $8,74 \cdot 10^{-8}$, $6,07 \cdot 10^{-7}$, $2,62 \cdot 10^{-6}$, $1,02 \cdot 10^{-8}$, $4,66 \cdot 10^{-7}$, $8,2 \cdot 10^{-8}$, $3,68 \cdot 10^{-7}$, $5,49 \cdot 10^{-7}$, $2,5 \cdot 10^{-8}$ A, respectivement. Ces données, ainsi que les ions pouvant correspondre à ces rapports m/z , sont présentés dans le tableau III-9.

Rapport m/z	Intensité maximale (A)	Intensité maximale relative	Ions correspondants
16	8,74E-08	3,3	O^+
17	6,07E-07	23,2	OH^+
18	2,62E-06	100	H_2O^+
28	1,02E-08	0,4	$^{12}C^{16}O^+$ $^{14}N_2^+$
32	4,66E-07	17,7	O_2^+ S^+
44	8,20E-08	3,1	CO_2^+
48	3,68E-07	14	SO^+
64	5,49E-07	20,9	SO_2^+
66	2,50E-08	1	$S^{18}O_2^+$

Tableau III-9 : récapitulatif des rapports m/z observés au cours de cette analyse, intensité maximale absolue et relative, et ions pouvant correspondre aux rapports m/z observés

Intéressons-nous maintenant à l'évolution de l'intensité de ces rapports m/z en fonction du gradient de température (figure III-55).

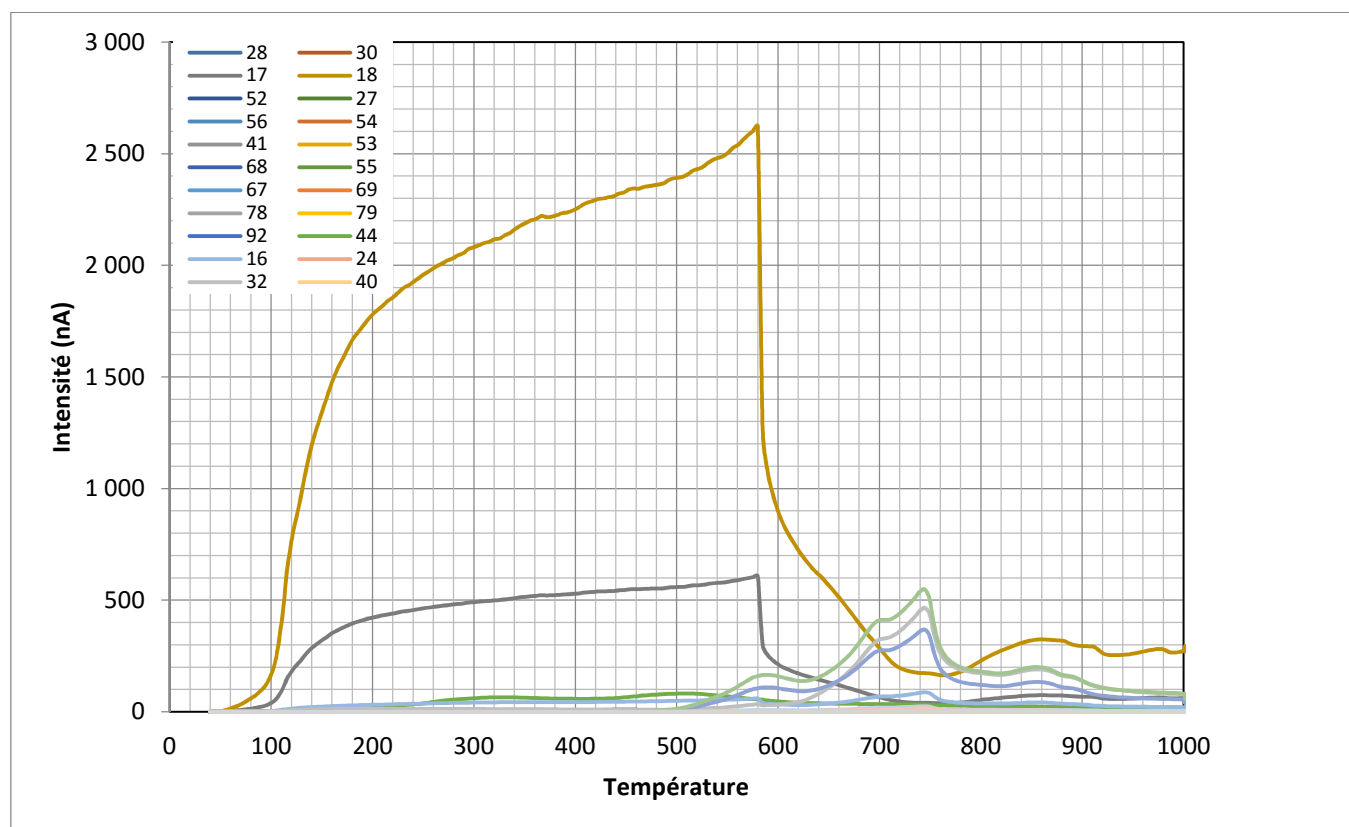


Figure III-55 : évolution de l'intensité du courant d'ion des différents rapports m/z ciblés, en fonction de la température

A première vue (figure III-55), deux espèces majoritaires sont libérées. La première commence à être libérée vers 60°C, avec point d'inflexion aux alentours de 100°C, un maximum à 580°C, puis décroît, avant de recroître en fin d'analyse. Au vu des rapports m/z impliqués (17 et 18), il semblerait que cette espèce soit de l'eau.

Une autre espèce semble être libérée en cinq étapes: 590°C, 701°C, 745°C, 853°C, et 887°C. Au vu des rapports m/z impliqués (32, 48 et 64), cette espèce pourrait être du SO₂.

Nous allons maintenant confirmer la présence de ces espèces en comparant les intensités relatives de leurs rapports m/z avec celles des spectres de masse de la librairie NIST. Nous allons également rechercher d'autres espèces attendues lors de ce type d'analyse (O₂, CO₂).

Dioxygène:

Commençons par les rapports caractéristiques de l'O₂ (figure III-56). Le rapport à $m/z = 16$ est causé par l'eau jusqu'à 580°C, puis par le SO₂. Cependant, on peut aussi voir le rapport à $m/z = 32$. Il n'est pas totalement expliqué par le SO₂ (représentant dans ce cas l'ion ³²S⁺), puisqu'il commence avant le dégagement principal de SO₂, il ne montre pas le pic à 590°C typique du comportement du SO₂ au cours de ce chauffage, et de plus, son pic est atteint en même temps que celui de l'eau à 580°C. Il pourrait donc y avoir un dégagement d'O₂ en même temps que celui de l'eau. Cet O₂ pourrait provenir de la décomposition thermique d'un oxychlorure (Leshin *et al.*, 2013), cependant, seulement des sulfates ont été détectés dans cet échantillon (Stalport *et al.*, 2012). Pour information, lors de l'analyse thermogravimétrique couplée à l'analyse des gaz libérés d'une K-jarosite (minéral représentant 36,2% de la masse de notre échantillon de Rio Tinto, *cf.* Stalport *et al.*, 2012), les auteurs n'ont pas observé de libération d'O₂ (Frost *et al.*, 2005).

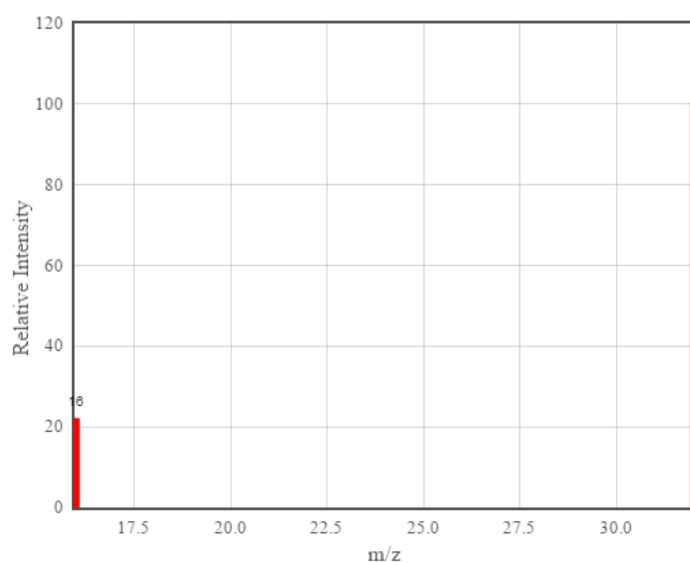
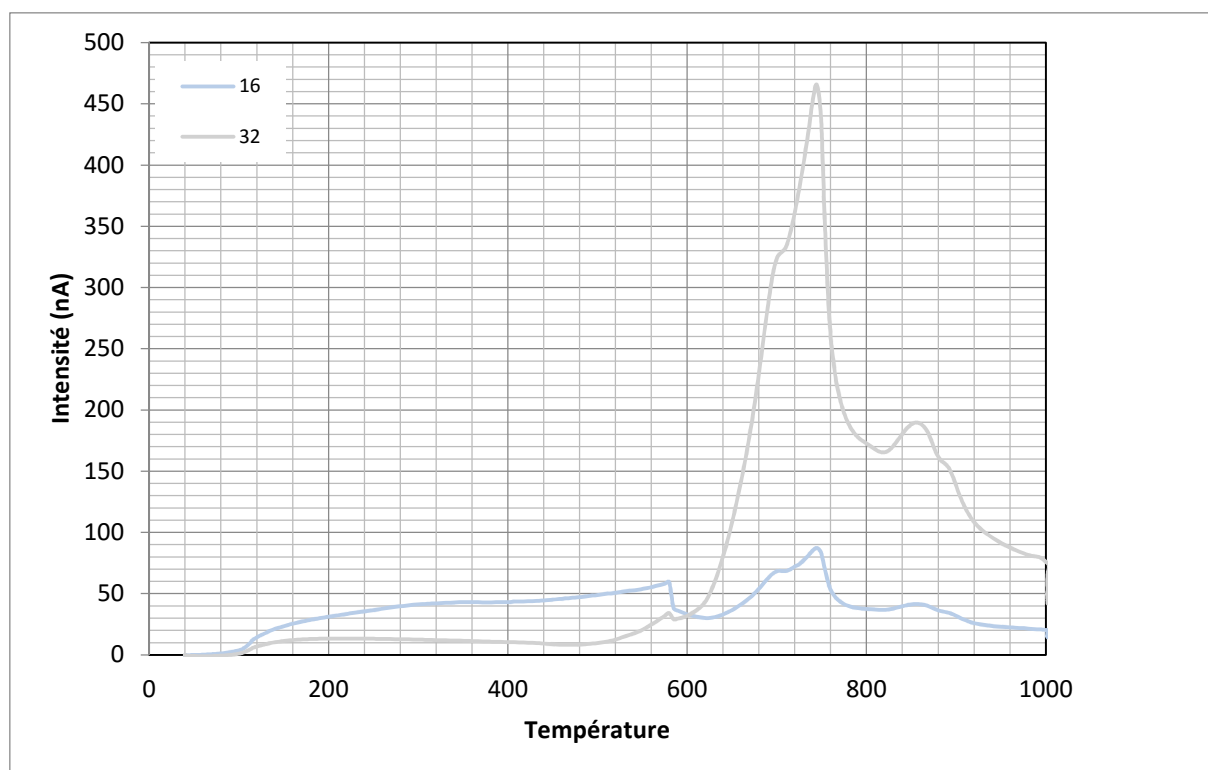


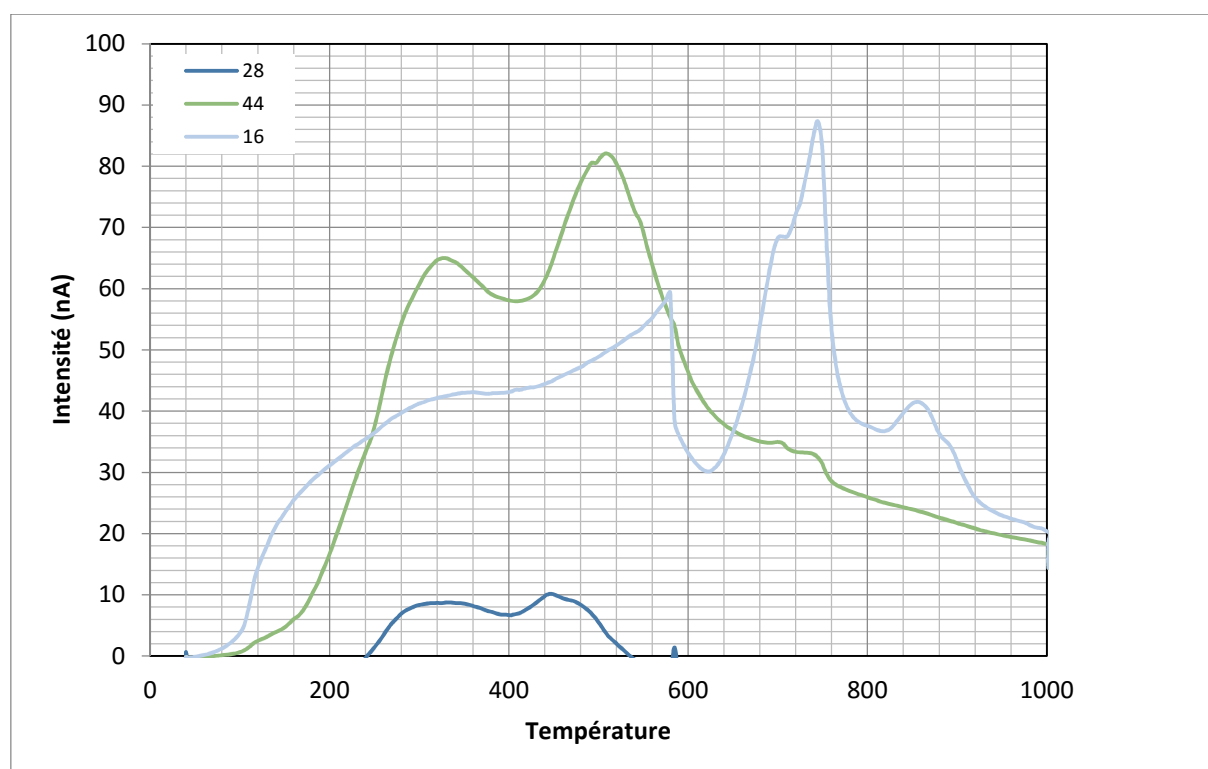
Figure III-56 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse de l' O_2 ; (b) spectre de masse typique de l' O_2

Dioxyde de carbone:

Ici, le rapport $m/z = 16$ ne permet pas d'interpréter, puisqu'il est causé par l'eau dans un premier temps et le SO_2 dans un second temps. On peut voir une libération d'une espèce (possiblement du CO_2) causant l'observation du rapport m/z 44, débutant à 72°C et avec quatre pics à 327°C, 507°C, 701°C, et 740°C.

Le rapport $m/z = 28$ pourrait provenir du CO_2 , cependant ici il ne montre pas exactement le même comportement que le rapport $m/z = 44$, indiquant potentiellement une origine différente et inconnue.

La détection de CO_2 ne semble pas attendue, puisqu'aucun carbonate n'a été détecté dans ce sol (Stalport *et al.*, 2012). Il pourrait cependant provenir d'une combustion de matière organique par l' O_2 possiblement détecté, ou de la décarboxylation de certaines molécules organiques (*cf.* interprétation donnée dans la partie portant sur l'échantillon d'Atacama (étape (ii)). En effet, cet échantillon est connu pour contenir des molécules organiques à des concentrations de l'ordre du ppt (éthylamine, sérine et glycine ; ainsi que l'ammoniac NH_3) et de l'ordre du ppb (méthylamine, valine, alanine et acide aspartique) (Stockton *et al.*, 2009). De plus, ce rapport $m/z = 44$ a déjà été détecté lors de l'analyse d'une jarosite, minéral contenu dans l'échantillon de Rio Tinto (*cf.* figure III-61), et pourrait ainsi provenir de la dégradation thermique de ce minéral. Les auteurs ne donnent pas d'interprétation quant à l'origine de ce rapport.



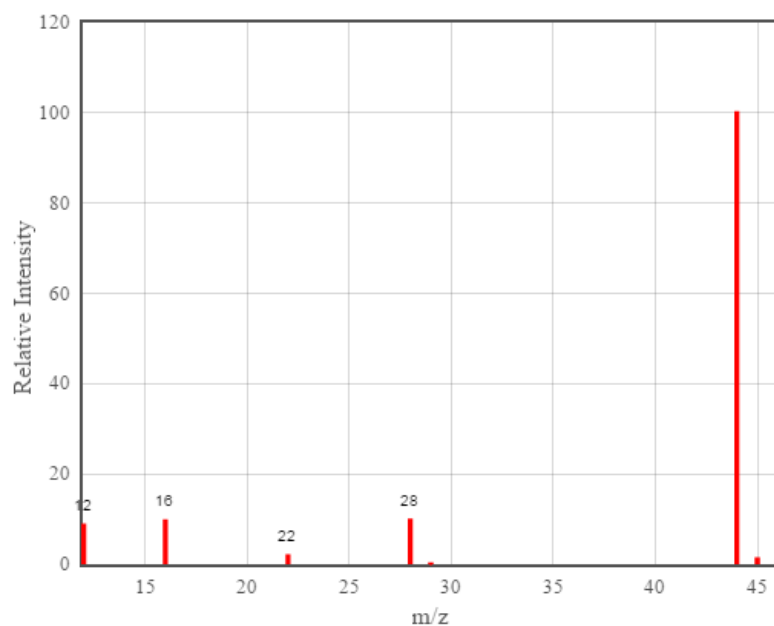


Figure III-57 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du CO_2 ; (b) spectre de masse typique du CO_2

Eau:

On peut observer une libération d'eau, et ce à forte intensité. Elle commence à être libérée vers 60°C, avec point d'inflexion aux alentours de 100°C, un maximum à 580°C, suivie immédiatement d'une pente décroissante marquée, puis d'un épaulement. Ensuite, de l'eau est à nouveau libérée avant la fin de l'analyse, avec trois maxima : 860°C, 907°C, et 976°C.

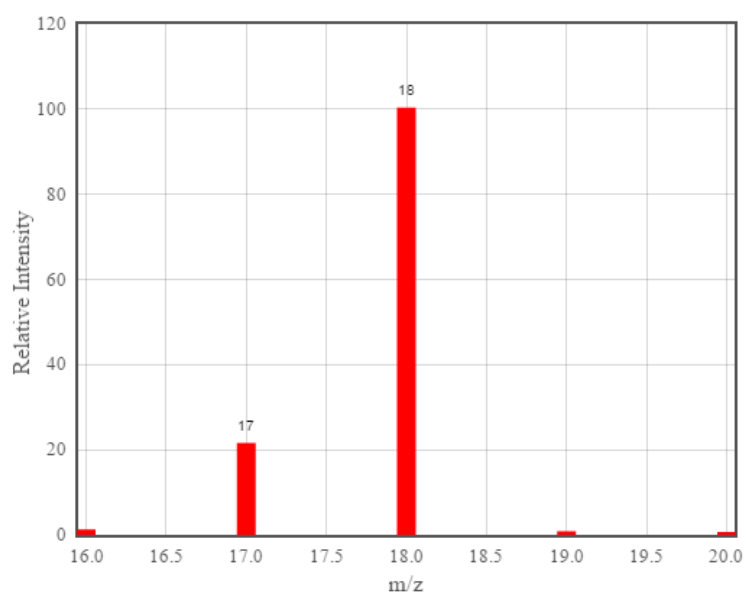
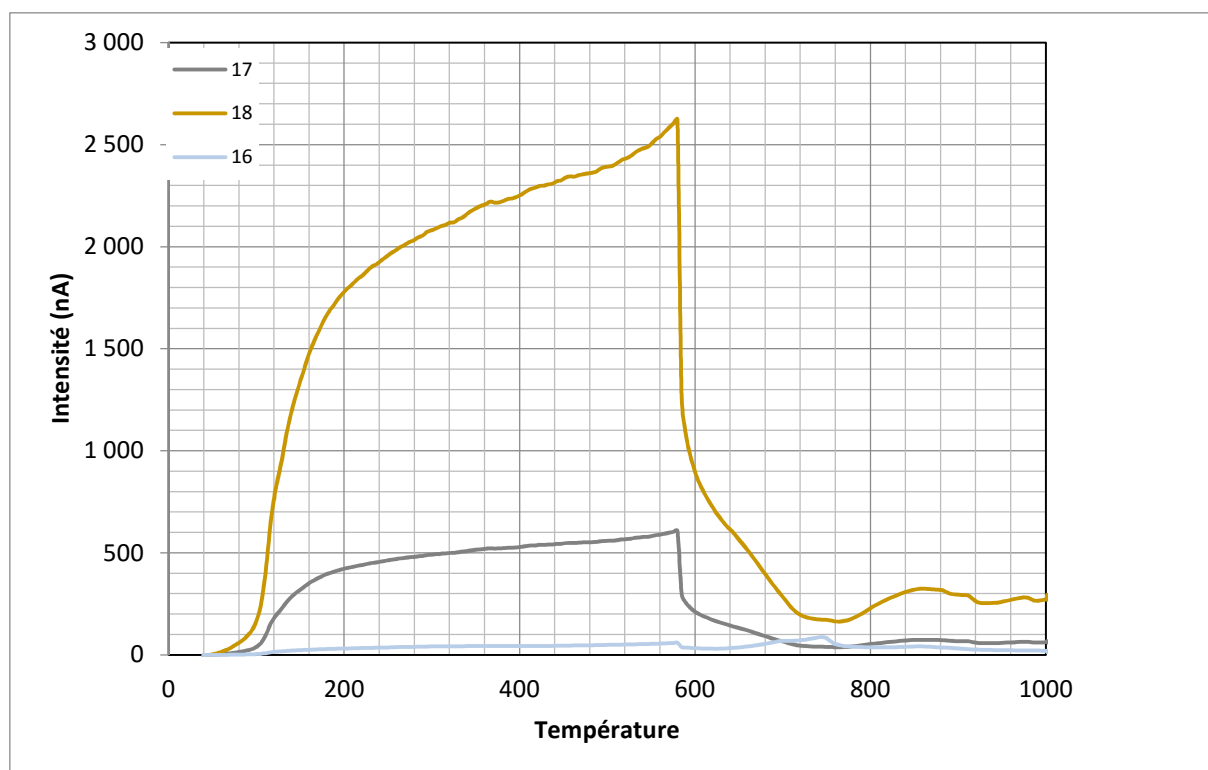


Figure III-58 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse de H_2O ; (b) spectre de masse typique de H_2O

Dioxyde de soufre:

Nous pouvons clairement voir une libération de SO_2 en deuxième partie d'analyse, débutant à environ $500^{\circ}C$, et avec cinq étapes de libération maximale : $590^{\circ}C$, $701^{\circ}C$, $745^{\circ}C$, $853^{\circ}C$, et $887^{\circ}C$.

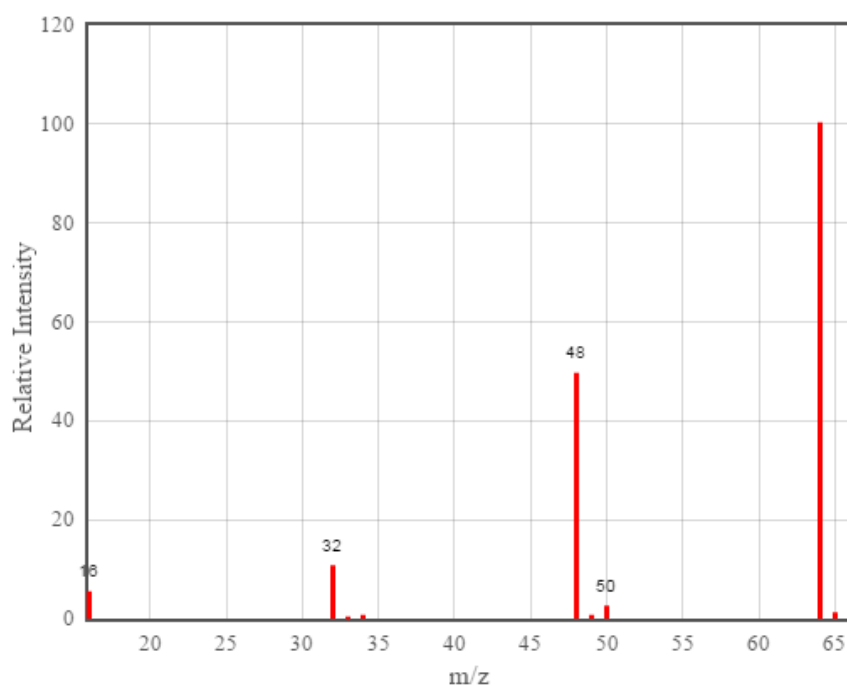
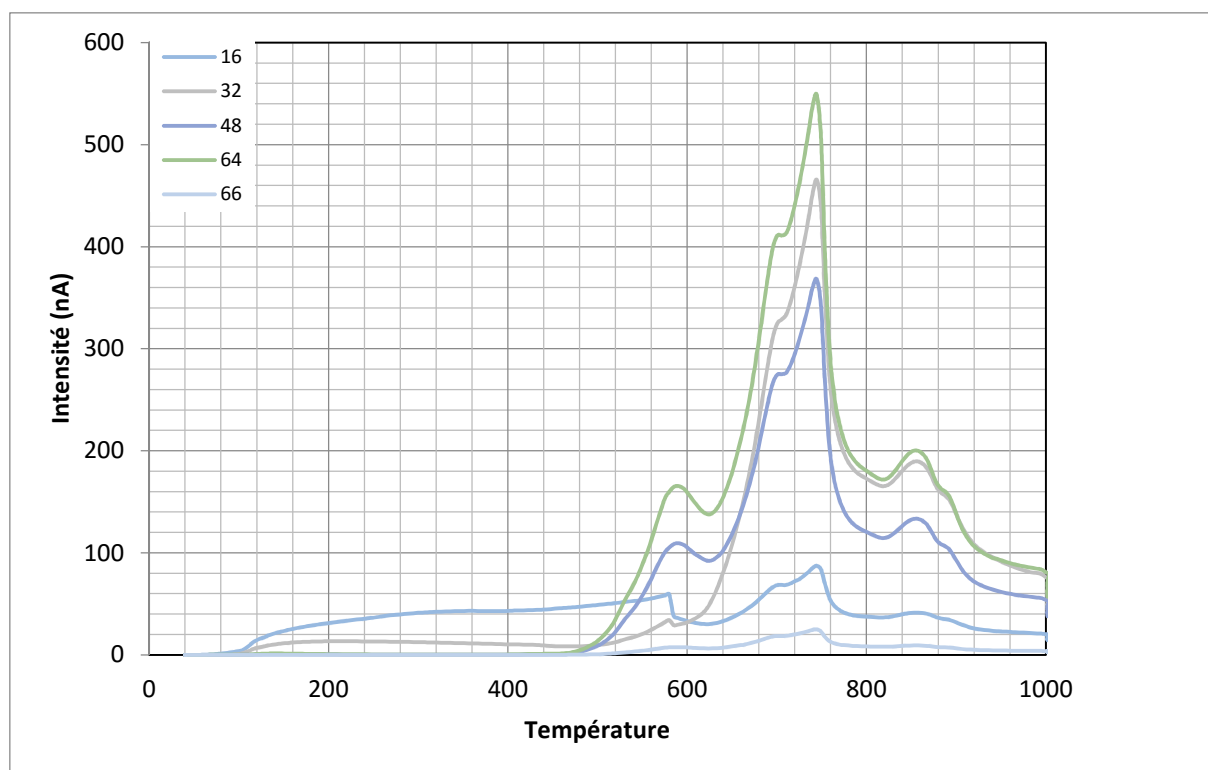


Figure III-59 : (a) rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et typiques du spectre de masse du SO_2 ; (b) spectre de masse typique du SO_2

Observons maintenant la figure III-60, dans laquelle sont représentées les courbes des intensités en fonction de la température, en les regroupant par espèce supposée, dans un même graphique grâce à une échelle logarithmique. On peut clairement y voir que les deux

espèces principalement libérées au cours de cette analyse sont l'eau (a) et le SO_2 (b). Le rapport $m/z = 16$ est commun aux deux espèces.

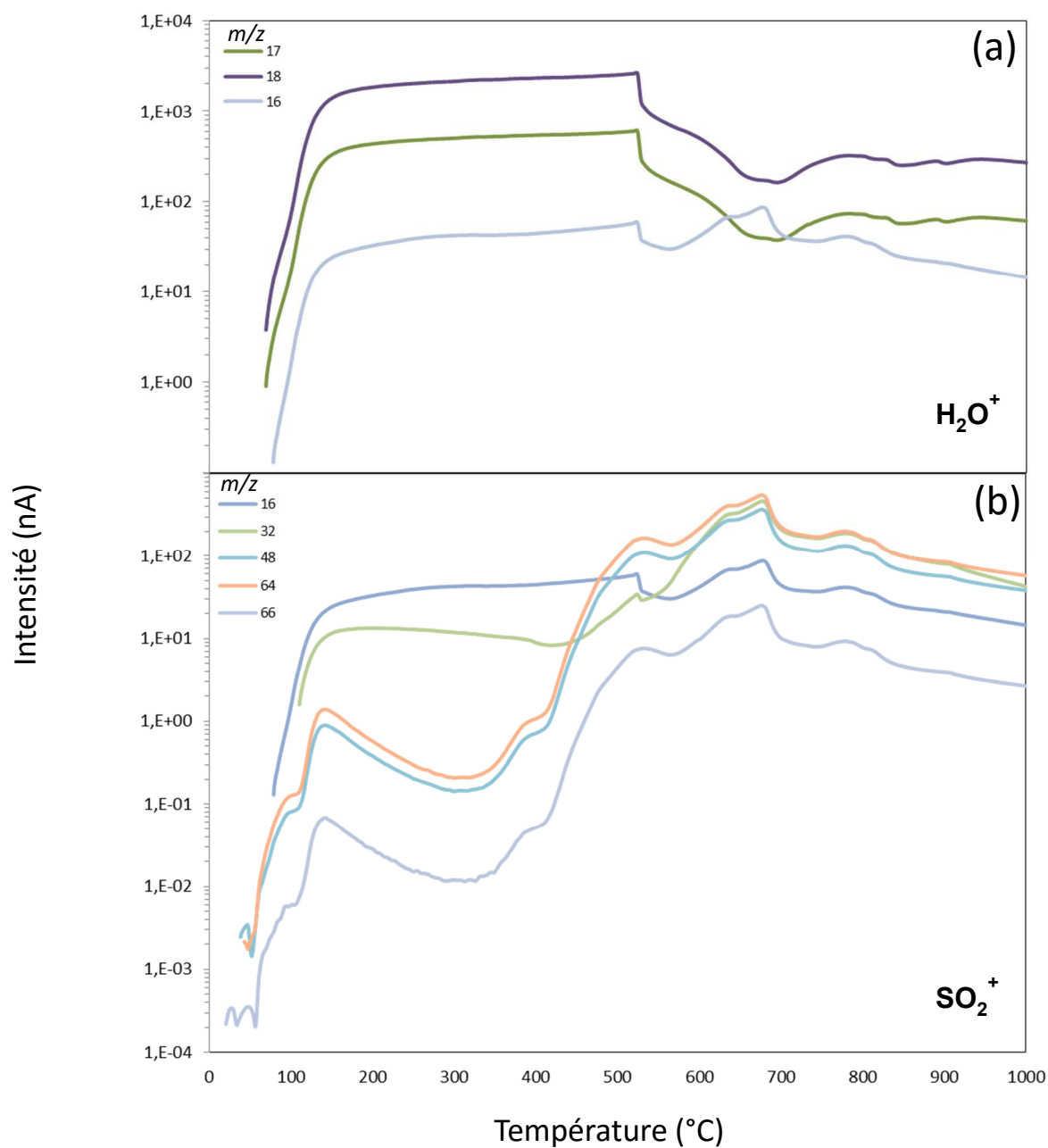


Figure III-60: Courbes d'intensité des ions pour Rio Tinto, chauffage à $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium. (a) Comparaison du signal MS de $m/z = 16, 17, 18$; (b) comparaison du signal MS de $m/z = 16, 32, 48, 64, 66$.

Pour résumer, nous avons donc :

(i) une libération d'eau qui commence aux alentours de 60°C, avec un point d'inflexion aux alentours de 100°C, un maximum à 580°C. Ensuite, l'intensité de la libération décroît, avant de recroître en fin d'analyse (maxima à 860°C, 907°C, et 976°C).

(ii) une libération d'espèce, pouvant être du CO₂, débutant à 72°C et avec quatre pics à 327°C, 507°C, 701°C, et 740°C.

(iii) une libération de SO₂ débutant à environ 500°C et se faisant en cinq étapes: 590°C, 701°C, 745°C, 853°C, et 887°C.

La courbe de l'intensité du rapport $m/z = 64$ (SO₂) en fonction de la température possède quatre maxima successifs (590°C, 701°C, 745°C, 853°C), caractéristique partagée avec la courbe observée pour ce même rapport par Frost *et al.* (2005) (figure III-61) lors de leur analyse d'une jarosite de potassium, ce qui pourrait être une confirmation des résultats de Stalport *et al.* (2012) quant à la présence de ce minéral dans l'échantillon de Rio Tinto. On peut également y observer le rapport $m/z = 44$, que nous observons également au cours de notre analyse.

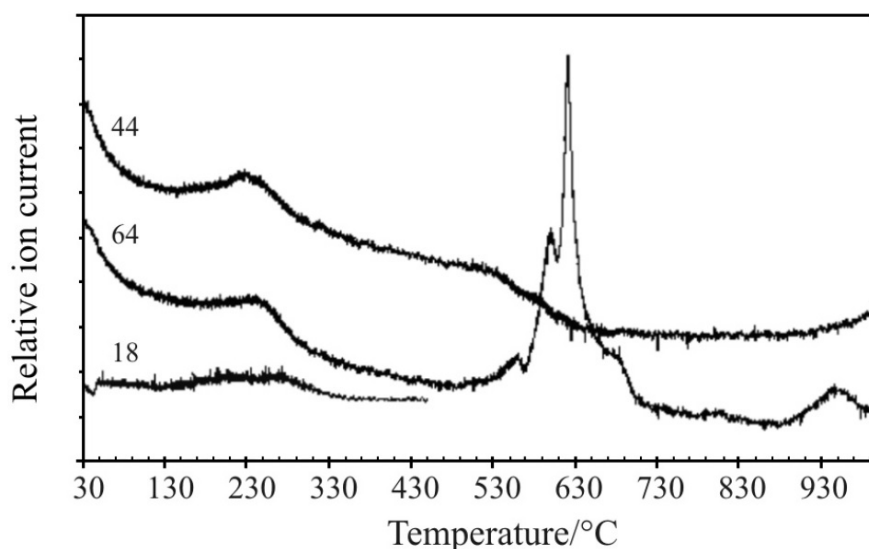


Figure III-61 : rapports m/z relatifs en fonction de la température pour l'analyse d'une jarosite de potassium (source : Frost *et al.*, 2005)

Corrélons maintenant ces données avec celles obtenues par TG et DSC.

*Etude des données TG et DSC, et corrélation avec les données
obtenues par MS*

La TG-DSC-MS sur Rio Tinto nous permet de représenter la masse (en % de la masse initiale) et la dérivée de la masse par rapport au temps (en $\%.\text{min}^{-1}$), qui permet de repérer les pertes de masse sous forme de pics (figure III-62).

Il est intéressant de noter des pertes de masse aux températures, dans un premier temps de 110°C, 171°C, 276°C (plus un épaulement à environ 310°C), deux pertes de vitesse moindre à environ 518°C et 597°C, puis de nouvelles pertes à 693°C, 744°C, 855°C et 890°C.

Un pourcentage de 62% de la masse totale est perdu, ce qui représente une différence considérable avec les sols d'Atacama et Svalbard (5%). Cette différence pourrait être due à la présence d'eau en quantité plus importante dans le sol de Rio Tinto.

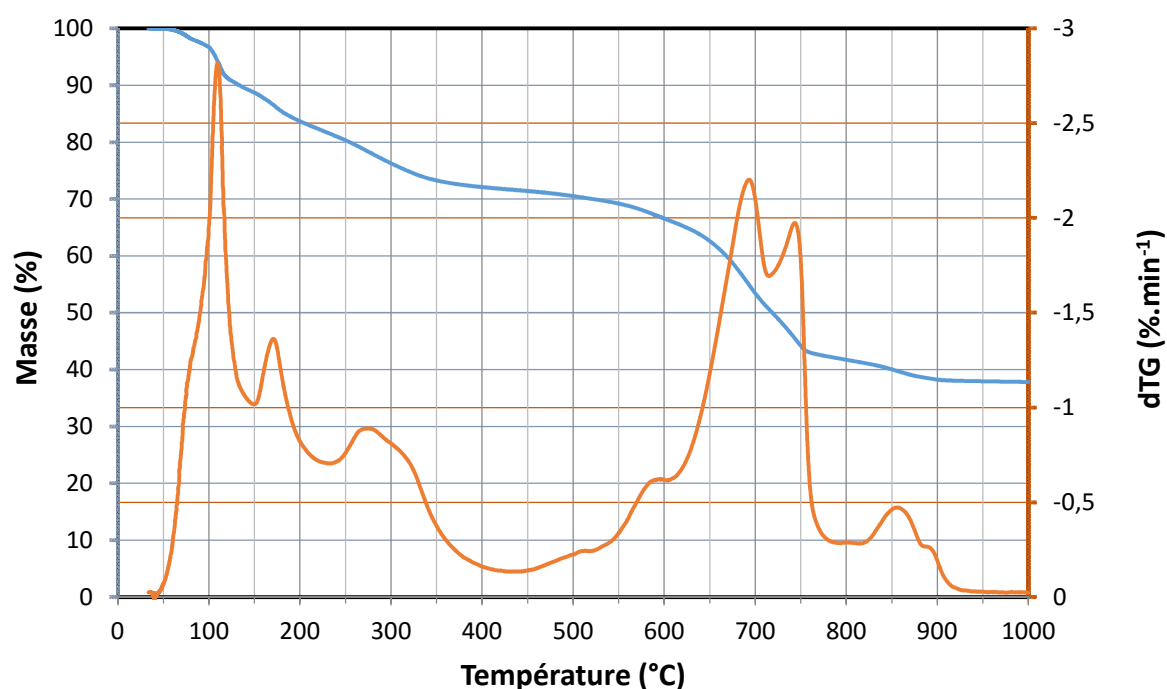


Figure III-62: courbes de TG et dTG pour Rio Tinto. Chauffage à 10°C/min, sous atmosphère d'hélium

Corrélons maintenant, dans la figure III-63, la courbe de dTG et celles des intensités des ions détectés.

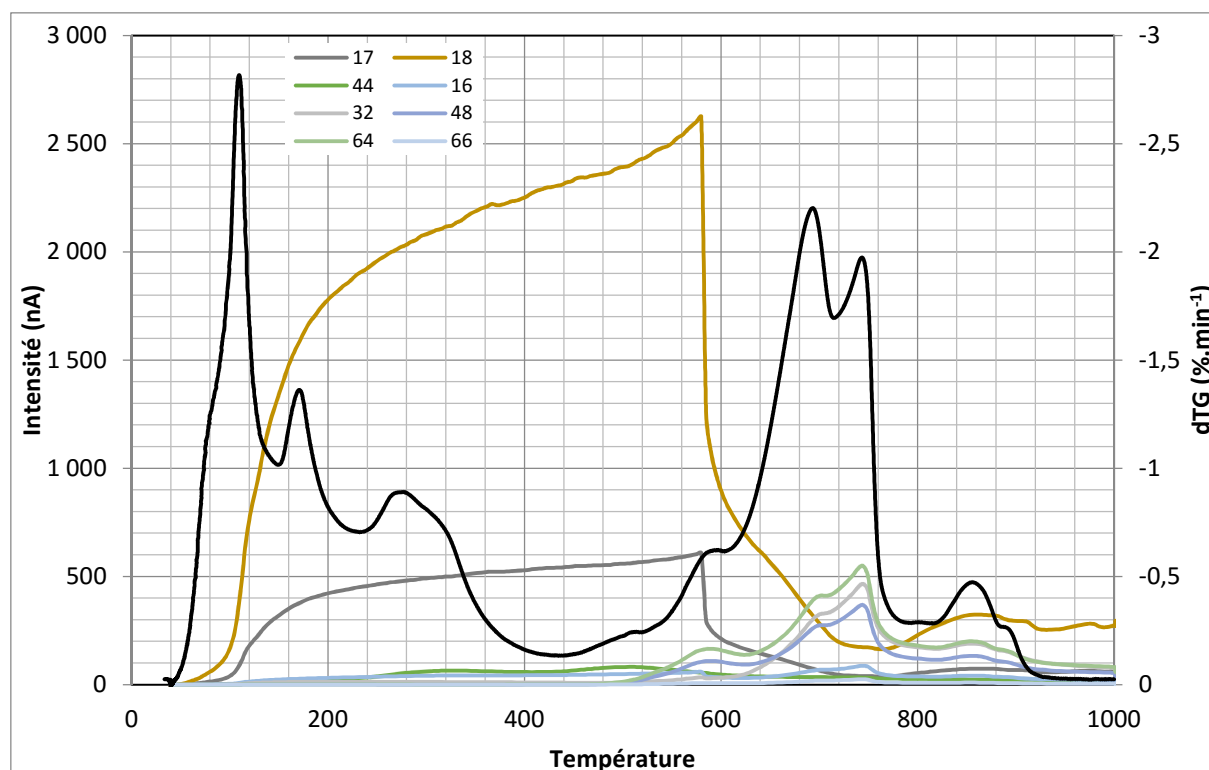


Figure III-63: courbes d'intensité des principaux rapports m/z détectés au cours de l'analyse, et courbe DTG ; en fonction de la température.

Les trois premières pertes de masse (110, 171 et 276°C) semblent correspondre à la libération d'eau (débutant à 60°C, inflexion à environ 100°C). Cette eau est de l'eau non structurée (l'eau structurée étant l'eau sous forme de groupements hydroxyles OH dans la structure des minéraux). Elle peut provenir des sulfates copiapite $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_4^{3+}(\text{SO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 20\text{H}_2\text{O}$, alunogène $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17(\text{H}_2\text{O})$, et amarantite $\text{Fe}_2^{3+}(\text{SO}_4)_2\text{O} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. En effet, l'eau de type $n(\text{H}_2\text{O})$ contenue dans ces trois minéraux est libérée à de faibles températures. On peut prendre l'exemple de l'amarantite, qui commence à perdre son eau de cristallisation dès 78°C (Frost *et al.*, 2013). Certaines de ces étapes, plus particulièrement les plus tardives, pourraient également inclure la libération d'eau par déshydroxylation de ces sulfates. Notamment, la jarosite se déshydroxyle entre 250 et 460°C (*cf.* tableau III-4). De plus, Frost *et al.* (2005) ont montré que la déshydroxylation d'une jarosite de potassium pouvait débuter dès 130°C.

La troisième étape de perte de masse (276°C), en particulier l'épaule à environ 310°C, pourrait également correspondre à la libération de l'espèce responsable du rapport m/z 44, possiblement du CO_2 (327°C).

La quatrième étape de perte de masse (518°C) semble encore correspondre à la libération de cette espèce mesurée par le spectromètre de masse (cette fois le pic d'intensité à 507°C).

La détection de ce rapport m/z 44 peut paraître surprenante, puisque l'échantillon ne contient pas de carbonates, mais elle a été observée par Frost *et al.* (2005) lors de l'analyse d'une jarosite de potassium, et correspond possiblement à un produit de la dégradation thermique des sulfates (les auteurs ne proposent pas d'explication quant à l'origine de ce rapport). Alternativement, si cette espèce correspond bien à du CO₂, elle pourrait provenir de la combustion / décarboxylation de matière organique présente dans l'échantillon.

La cinquième étape de perte de masse (597°C) correspond au pic maximal de libération d'eau (580°C), mais également au premier pic de libération de SO₂ (590°C). A cette température, l'eau libérée provient certainement de la déshydroxylation des sulfates. Le SO₂ détecté provient probablement de la dégradation thermique des sulfates.

La sixième étape de perte de masse (693°C) pourrait correspondre à l'épaulement sur la courbe décroissante des rapports m/z caractéristiques de la libération d'eau ; ainsi qu'au second pic de libération de SO₂ (701°C) ; et au troisième pic de libération de l'espèce responsable du rapport m/z 44 (701°C).

La septième étape (744°C) correspond à la libération maximale de SO₂ (745°C) mais aussi à une libération de l'espèce responsable du rapport m/z 44 (740°C).

La huitième étape (855°C) correspond encore une fois à une libération de SO₂ (853°C), mais aussi une libération d'eau (860°C).

La neuvième et dernière (étape 890°C) correspond encore une fois à la libération de SO₂ (887°C).

Les deux dernières étapes de libération d'eau (907 et 976°C) ne semblent pas liées à une perte de masse particulière.

Toutes ces libérations d'espèces proviennent de la dégradation thermique des sulfates (plus précisément, de réactions de déshydroxylation pour la libération d'eau, et désulfatation pour la libération de SO₂). La libération de l'espèce responsable du rapport m/z 44 est quant à elle possiblement causée par la dégradation thermique des sulfates (notamment la jarosite) ;

ou alternativement (si cette espèce est bien du CO_2) par la combustion / décarboxylation de molécules organiques.

Le thermogramme DSC est comparé à la courbe dTG dans la figure III-64. L'artefact en début d'analyse est toujours présent et complique l'interprétation des données.

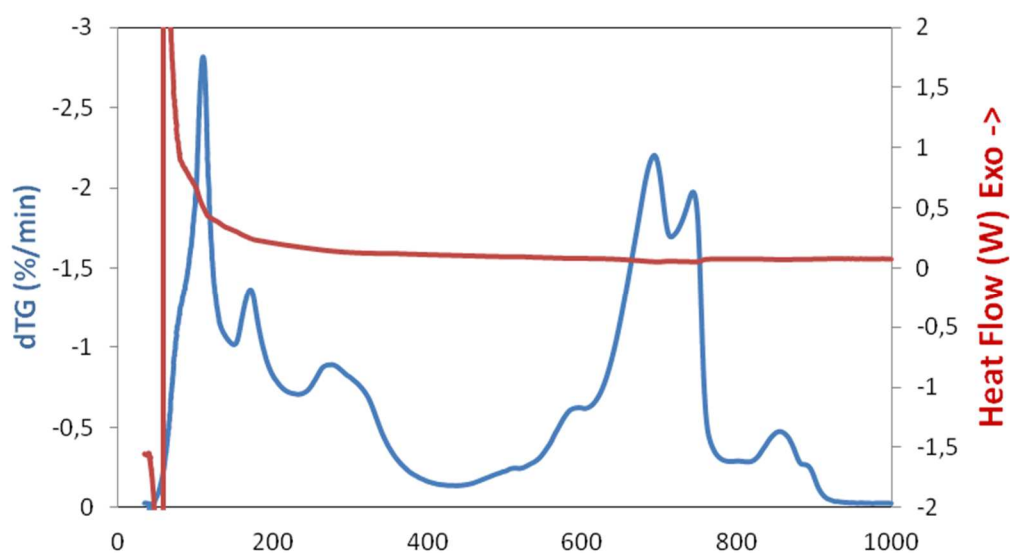


Figure III-64: courbes de dTG et DSC pour Rio Tinto. Chauffage à $10^\circ\text{C}/\text{min}$, sous atmosphère d'hélium

Zoomons sur la première étape de perte de masse (constituée de deux pics se chevauchant).

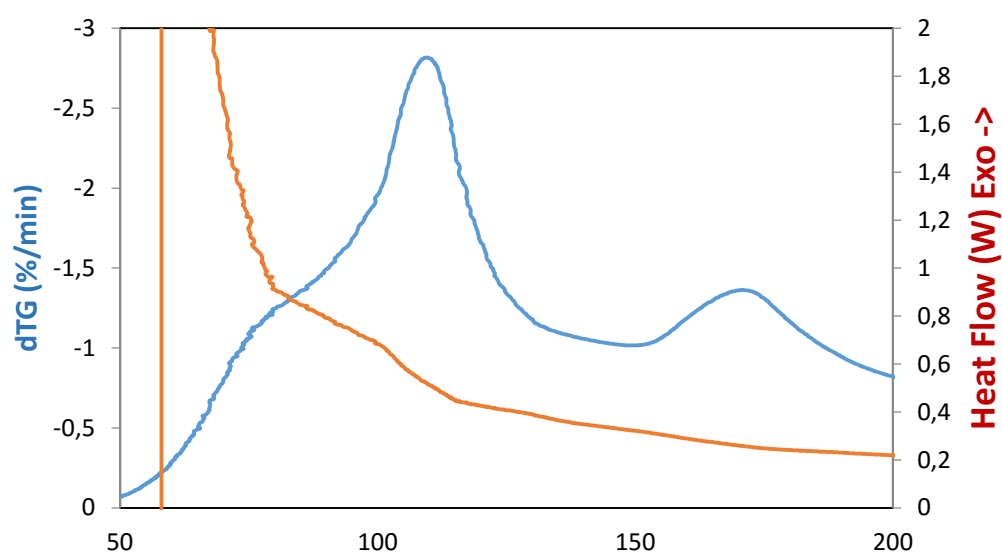


Figure III-65 : courbes de dTG et DSC pour Rio Tinto (zoom sur une partie de la courbe). Chauffage à $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, sous atmosphère d'hélium

Il faut imaginer la ligne de base comme un arc de cercle (Lu, communication personnelle). On peut alors voir que le premier pic (épaulement) est une réaction endothermique. Le second pic (que nous avons considéré comme la première étape de perte de masse à 110°C) représente lui aussi une réaction endothermique. La deuxième étape de perte (pic à 171°C) semble elle aussi endothermique.

Effectuons maintenant un zoom inverse pour observer le reste de la courbe.

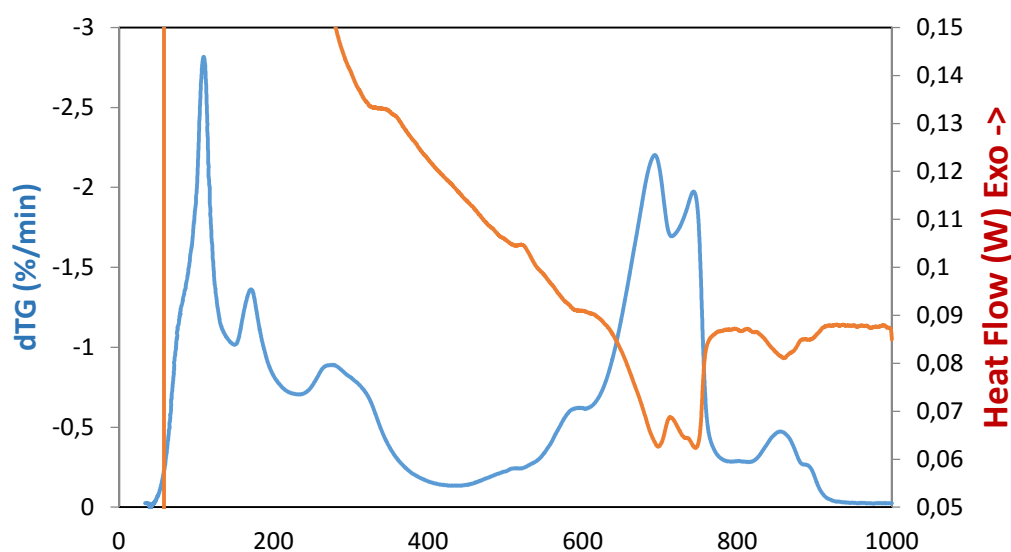


Figure III-66 : courbes de dTG et DSC pour Rio Tinto (zoom sur une partie de la courbe). Chauffage à 10°C.min⁻¹, sous atmosphère d'hélium

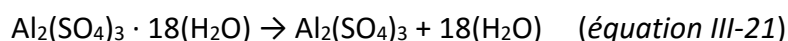
Pour chaque étape de perte de masse, nous avons une réaction associée qui est endothermique. Même si certaines portions de la courbe du flux de chaleur semblent correspondre à des réactions endothermiques (c'est-à-dire des pics supérieurs à la ligne de base), ces pics correspondent en fait à des rétablissements de la ligne de base (qui est courbe) suite à une réaction endothermique (et donc un pic inférieur à la ligne de base) (Lu, communication personnelle). Ceci est en accord avec l'ensemble de nos interprétations précédentes, puisque les réactions de déshydratation, de déshydroxylation, et désulfatation des sulfates sont toutes des réactions endothermiques.

Pour poursuivre l'interprétation, nous pouvons observer plusieurs étapes au cours de l'analyse de l'échantillon de Rio Tinto :

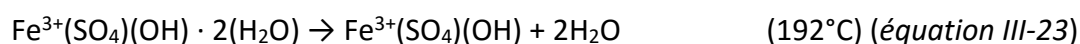
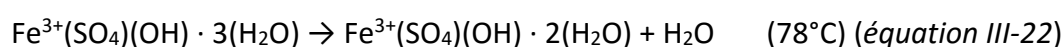
(i) Une libération d'eau, du début de l'analyse jusqu'à 580°C, correspondant aux étapes de perte de masse à 110°C, 171°C, 276°C, 518°C, 597°C.

L'eau libérée est dans un premier temps de l'eau non-structurale (résultant de la déshydratation des sulfates).

La déshydratation de l'alunogène a par exemple été observée dans la gamme 115 – 320°C par August (1991), selon l'équation :

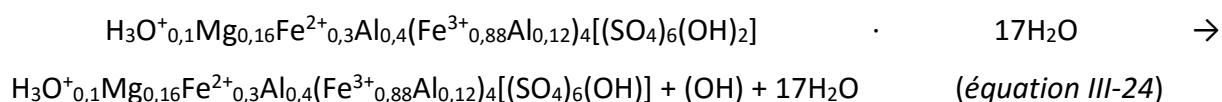


La déshydratation de l'amarantite a été observée à 78°C et 192°C (Frost *et al.*, 2013) :



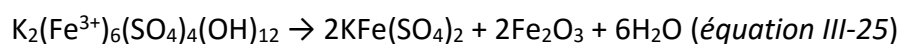
La formule de l'amarantite acceptée par l'IMA (« International Mineralogical Association ») est $\text{Fe}_2^{3+}(\text{SO}_4)_2\text{O} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cependant, elle peut également être écrite de la manière présentée ci-dessus, c'est-à-dire $\text{Fe}^{3+}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ (Frost *et al.*, 2013).

La déshydratation d'une copiapite a été observée en six étapes par August (1991) dans la gamme 130 – 340°C (incluant également une déshydroxylation lors de la dernière étape à 340°C) :



Certaines des étapes de perte de masse correspondant à la libération d'eau peuvent inclure la libération d'eau structurale (résultant de la déshydroxylation des sulfates).

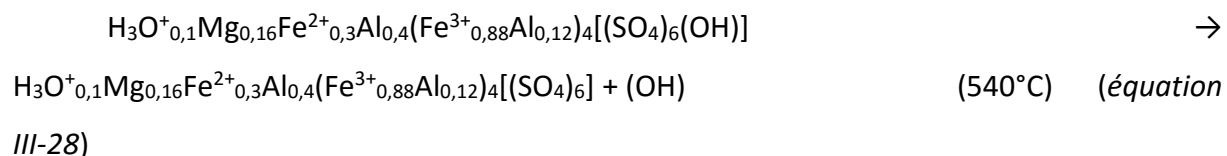
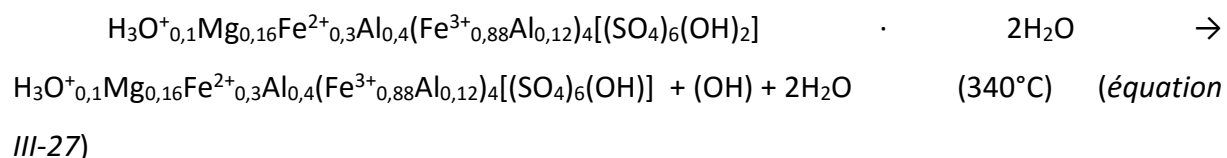
Par exemple, la déshydroxylation d'une jarosite de potassium a été observée dans la gamme 130 – 330°C, selon l'équation (Frost *et al.*, 2005):



La déshydroxylation de l'amarantite a quant à elle été observée à 550°C, selon l'équation (Frost *et al.*, 2013) :



La déshydroxylation d'une copiapite (partiellement déshydratée) a été observée à 340°C (accompagnée d'une déshydratation) et 540°C (August, 1991) :

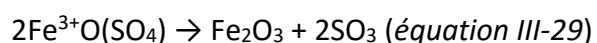


(ii) La libération d'une espèce causant l'observation du rapport m/z 44, débutant à 72°C, présente jusqu'en fin d'analyse, avec quatre pics d'intensité à 327°C, 507°C, 701°C, 740°C ; pouvant correspondre aux étapes de perte de masse à 276°C, 518°C, 701°C et 744°C, respectivement. Cette espèce, possiblement du CO_2 (cependant, le rapport m/z 28 ne suit pas le même comportement que le rapport m/z 44), pourrait correspondre à un produit de la dégradation thermique des sulfates. En effet, Frost *et al.* (2005) ont observé ce même rapport lors de l'analyse d'un échantillon de jarosite de potassium (figure III-61). Les auteurs ne proposent pas d'explication quant à l'origine de ce rapport. Alternativement, si cette espèce est bien du CO_2 , elle pourrait provenir de la combustion ou de la décarboxylation de matière organique présente dans l'échantillon.

(iii) Une libération de SO_2 , débutant à 500°C, avec 5 pics d'intensité à 590°C, 701°C, 745°C, 853°C et 887°C, pouvant correspondre aux étapes de pertes de masse à 518°C, 597°C, 693°C, 744°C, 855°C et 890°C, respectivement. Cette libération de SO_2 est causée par la dégradation thermique des sulfates.

Par exemple, Frost *et al.* (2005) ont observé la dégradation thermique d'une jarosite de potassium dans la gamme 501 – 622°C, avec libération de SO_2 (les auteurs ne proposent pas d'équation de réaction).

La dégradation thermique de l'amarantite a été observée par Frost *et al.* (2013) à 641°C, selon l'équation :



Il est intéressant de noter qu'au cours de notre analyse, nous n'avons pas observé le rapport m/z 80 (caractéristique du SO_3). Il semblerait donc que les sulfates présents dans notre échantillon n'aient pas produit de SO_3 en se dégradant, ou que ce SO_3 n'ait pas été détecté en tant que tel.

La dissociation des groupements sulfates d'une copiapite a été observée à 740°C, 810°C et 960°C (August, 1991). Les auteurs ne proposent pas d'équation de dégradation.

(iv) Un pic de libération d'eau à 860°C, correspondant à l'étape de perte de masse à 855°C. Cette eau est certainement de l'eau structurale provenant de la déshydroxylation des sulfates, possiblement de l'amarantite et/ou de la copiapite (la jarosite se déshydroxylant dans la gamme 130 – 330°C ; Frost *et al.*, 2005), bien que des températures de déshydroxylation observées pour ces deux sulfates soient de 550°C pour l'amarantite (Frost *et al.*, 2013), et 340 et 540°C (August, 1991).

(v) Deux pics de libération d'eau, à 907°C et 976°C. Le pic à 907°C pourrait être en partie expliqué par la perte de masse à 890°C (si tel est le cas, cette libération d'eau serait à nouveau explicable par la déshydroxylation des sulfates). Le pic à 976°C ne correspond quant à lui à aucune étape de perte de masse.

Un résumé des différentes étapes observées lors de l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol de Rio Tinto est présenté dans le tableau III-10. Nous avons ainsi pu observer au cours de cette analyse une libération d'eau dans la gamme 60°C - 580°C, avec un maximum à 580°C. Cette détection peut être causée par la libération d'eau de porosité / adsorption / hydratation des sulfates, mais aussi par la perte de l'eau de cristallisation de l'alunogène, l'amarantite et la copiapite (la jarosite n'en possédant pas). Certaines étapes de cette libération d'eau peuvent également inclure la déshydroxylation (perte d'eau structurale) de la jarosite, de l'amarantite et de la copiapite.

Une espèce, possiblement du CO₂, caractérisée par le rapport m/z 44, et dont la présence est causée soit par la dégradation thermique des sulfates, soit par la combustion / décarboxylation de molécules organiques, est observée de 72°C jusqu'en fin d'analyse, avec un premier pic d'intensité à 327°C, et un dernier pic à 740°C.

Du SO₂ est libéré de 500°C jusqu'en fin d'analyse, avec cinq pics d'intensité. Ce SO₂ provient de la dégradation thermique des sulfates présents dans l'échantillon.

De l'eau est à nouveau libérée (maximum à 860°C), provenant probablement de la déshydroxylation de l'amarantite et/ou de la copiapite. Le pic d'intensité à 907°C possède la

même origine s'il est bien lié à la perte de masse à 890°C. Le dernier pic de libération d'eau ne semble lié à aucune perte de masse, et son origine reste indéterminée.

Etapes de libération	Températures de libération	Espèce(s) libérée(s)	Perte(s) de masse (pics DTG)	Phénomène(s)
(i)	gamme 60 - 580°C	H ₂ O	110°C, 171°C, 276°C, 518°C, 597°C	Libération d'eau de porosité / adsorption / hydratation; libération d'eau de cristallisation de l'alunogène (éq.III-21), amaranтите (éqs.III-22, III-23) et copiapite (e.g., éq.III-24); déshydroxylation de la jarosite (éq.III-25), amaranтите (éq.III-26), copiapite (e.g., éqs.III-27, III-28)
(ii)	début 72°C, pics à 327°C, 507°C, 701°C, 740°C	CO ₂ ou autre espèce	276°C, 518°C, 693°C, 744°C	Libération de CO ₂ provenant de la décarboxylation ou combustion de molécules organiques, ou libération d'une espèce provenant de la dégradation thermique des sulfates
(iii)	début 500°C, pics à 590°C, 701°C, 745°C, 853°C, 887°C	SO ₂	518°C, 597°C, 693°C, 744°C, 855°C, 890°C	Dégradation thermique des sulfates
(iv)	860°C	H ₂ O	855°C	Déshydroxylation amaranтите et/ou copiapite
(v)	907°C et 976°C	H ₂ O	890°C, N/A	Non déterminé

Tableau III-10 : résumé des étapes de libération d'espèces au cours de l'analyse TG-DSC-MS de l'échantillon de sol de Rio Tinto

La masse perdue lors de la libération initiale d'eau (du début jusqu'à 580°C) représente environ 34% de la masse totale. Celle du SO₂ représente 28% de la masse totale. Nous sommes donc en présence d'un sol riche en eau, relativement aux sols d'Atacama et de Svalbard (la perte totale de masse dans ces sols, eau et autres espèces confondues, ne dépassait pas 5%).

Une partie de cette eau (représentant environ 11% de la masse du sol) est rapidement relâchée en début d'analyse (l'étape de perte de masse à 110°C, réaction se terminant à

150°C), et est de l'eau non-structurale (par opposition à l'eau structurale qui est de l'eau présente sous la forme de groupements OH au sein des minéraux). Cette eau pourrait être facilement disponible pour réagir avec le MTBSTFA lors de la réaction de fonctionnalisation en présence de DMF à 75°C pendant 15 minutes. Elle pourrait alors être responsable de la diminution du rendement de la fonctionnalisation observée en partie 3.3). Ceci expliquerait la différence dans le rendement de fonctionnalisation observé entre Rio Tinto et les deux autres sols. Cependant, Rio Tinto possède également des sels (sulfates hydratés), facteur qui est également absent des caractéristiques des deux autres sols. Nous allons donc poursuivre nos expériences afin de déterminer quel agent est responsable de la réduction du rendement de la fonctionnalisation : l'eau non-structurale, ou les sels.

3.4.3) Conclusion

Grâce aux techniques d'analyse thermique employées, nous avons pu proposer pour l'échantillon d'Atacama la possible présence d'un phyllosilicate de type TO (1:1) ou TOT:O (2:1:1 ou 2:2), ainsi que d'un carbonate, possiblement de la magnésite. Pour l'échantillon de Svalbard, nous avons pu confirmer la présence de smectites, et en préciser la nature: nontronite et saponite. Pour l'échantillon de Rio Tinto, nous avons pu confirmer la présence de sulfates.

De manière plus importante (dans le cadre de notre étude), comparativement aux autres sols, les quantités d'eau présentes dans Rio Tinto sont plus importantes. La non-détection des acides aminés, suite à leur fonctionnalisation avec du MTBSTFA préalablement chauffé en présence de ce sol, pourrait alors s'expliquer par la libération d'eau par les sulfates hydratés présents dans l'échantillon de Rio Tinto au cours de la fonctionnalisation, ou par la présence d'ions sulfates, bien qu'un chauffage à une telle température semble trop faible pour libérer les ions sulfates de la structure minérale. Cette eau pourrait également être de l'eau non-structurale, de nature porosité / adsorption / solvation (donc pas forcément de l'eau non-structurale de type cristallisation présente dans les sulfates). Il serait par conséquent intéressant de chauffer Rio Tinto avant son étape de chauffage en présence du MTBSTFA, afin d'évaporer l'eau non-structurale présente dans le sol. Si les acides aminés ne sont toujours pas détectés, c'est que l'eau n'est pas en cause. Il serait également intéressant de chauffer à

différentes températures, afin d'identifier le type d'eau responsable, si l'eau est bien responsable.

3.5) 3^{ème} partie : focus sur Rio Tinto

3.5.1) Introduction

A la lumière des résultats obtenus lors de la deuxième partie de ce troisième chapitre, nous suspectons l'eau non-structurale d'être responsable de la non-détection des acides aminés dans le cas de l'expérience avec l'échantillon de sol de Rio Tinto, à cause de sa plus grande quantité en comparaison avec les deux autres sols. Ce type d'eau (présente par exemple dans les pores du sol, ou bien adsorbée sur la surface des grains, ou formant une couche de solvation autour des grains, ou résultant de la déshydratation de certains sels, ou encore contenue entre les couches de certains phyllosilicates) est facilement libérée lors d'un chauffage à faible température, tel que celui nécessaire pour réaliser la réaction de fonctionnalisation. Elle pourrait alors réagir avec le MTBSTFA, conduisant à ce que l'on considère comme étant une désactivation chimique du MTBSTFA par la matrice minérale. Il s'agirait plus précisément de la réaction du MTBSTFA avec de grandes quantités d'eau, ce qui limiterait alors la quantité de MTBSTFA disponible pour la fonctionnalisation des acides aminés. Un facteur cinétique est également envisageable : en effet, lorsque la fonctionnalisation a lieu en présence d'eau, la concentration en eau étant supérieure à la concentration en acides aminés, la réaction entre l'eau et le MTBSTFA se fait plus rapidement que celle entre les acides aminés et le MTBSTFA, aboutissant à un rendement de fonctionnalisation des acides aminés plus faible.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons donc chauffer l'échantillon afin d'en évaporer l'eau non-structurale. Ensuite, nous allons refaire exactement la même expérience qu'en partie 1 de ce chapitre. De cette manière, nous verrons si cela suffit à résoudre le problème. Si tel est le cas, ce sera important vis-à-vis de la recherche de molécules organiques à la surface de Mars, puisque des sols présentant les mêmes caractéristiques y existent (présence d'eau non-structurale). De plus, il se trouve que ce sont des sols dans lesquels on

risque de chercher, puisqu'ils indiquent la présence d'eau dans le passé de la planète. Un bon exemple en est la mission MSL, qui recherche des molécules organiques dans des sols contenant des sulfates et des phyllosilicates.

Ensuite, nous allons augmenter le ratio quantité de MTSBTFA sur quantité de sol, sans chauffage préalable du sol. Si, dans ces conditions, la détection des acides aminés est possible, nous aurons mis en évidence une deuxième méthode permettant la détection des acides aminés.

Ensuite, si la première expérience fonctionne, nous allons reproduire la même expérience mais en chauffant à une température moins élevée, pour voir si cela fonctionne aussi.

Une fois ces expériences réalisées, nous réaliserons des tests sur le sol dopé. Dans ces tests, on aura une influence non plus seulement de la famille de facteurs (i), mais des deux familles de facteurs à la fois.

Nous allons tout d'abord réaliser une expérience dans laquelle nous utiliserons la même quantité de matière d'acides aminés que la valeur optimiste attendue sur Mars, en utilisant des ratios quantité de sol : quantité de réactifs de fonctionnalisation similaires.

Ensuite, nous allons tester avec les mêmes quantités d'acides aminés qu'avec les premières expériences. Si le fait de varier le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol a fonctionné lors du premier type d'expériences, alors nous allons essayer avec ce même ratio, cependant cette fois sur un sol dopé.

3.5.2) Hypothèses, protocoles et résultats

3.5.2.0) Référence

Le protocole pour l'établissement de la référence est strictement le même qu'au paragraphe 3.3.1.a).

3.5.2.1) Sol non dopé

3.5.2.1.1) Expérience 1 (sol chauffé, 10 min. @ 150°C)

Hypothèse

Notre première hypothèse pour cette série d'expériences est que la présence importante d'eau non-structurale dans le sol de Rio Tinto est le facteur responsable de la non-détection des acides aminés, lors de l'expérience réalisée en première partie de ce troisième chapitre.

Protocole

Avant d'ajouter le mélange MTBSTFA/DMF au sol, nous avons réalisé un chauffage de ce sol, pendant 10 minutes à une température de 150°C, afin d'en éliminer une partie de l'eau non-structurale. Nous avons choisi cette température de 150°C, car elle marque la fin de la première étape de perte de masse (évaporation d'eau non-structurale) identifiée lors de l'analyse TG-DSC-MS sur l'échantillon de Rio Tinto. Les résultats obtenus grâce à ce protocole seront comparés à la référence, afin de déterminer le recouvrement des acides aminés.

Une masse de 25 mg de sol est pesé, ajouté dans un vial, et chauffée pendant 10 minutes à 150°C dans un four, vial ouvert, pour permettre l'évaporation d'eau à l'extérieur du vial. Ensuite, un mélange pur de MTBSTFA/DMF est ajouté au vial (120 et 40 μL , respectivement, donc un volume total de réactif de 160 μL , correspondant à un ratio DMF : MTBSTFA de 1 : 3), le tout est mélangé grâce à un vortex, et chauffé à 75°C pendant 15 minutes. Le vial est centrifugé (3500 tours par minute pendant 3 minutes), 80 μL de surnageant est prélevé, et utilisé pour fonctionnaliser (75°C, 15 min) une quantité de matière de $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol d'acides aminés (100 mL de la solution standard évaporée). Ensuite, le fonctionnalisat est injecté pour analyse par CPG-SM.

Résultats

Cette fois-ci, les acides aminés sont bien détectés (figure III-67, tableau III-11). L'inhibition de la fonctionnalisation est donc évitée si Rio Tinto est précédemment chauffé à

150°C pendant 10 minutes. La présence d'eau non-structurale dans le sol semble donc responsable de la non-détection des acides aminés, en réagissant avec la totalité du MTBSTFA ajouté. Même si de l'eau structurale (OH) est libérée par certains sulfates en chauffant à 150°C (par exemple une K-jarosite qui se déhydroxyle entre 130°C et 330°C, *cf.* Frost *et al.*, 2005), la contribution de ce type d'eau sera probablement minime en comparaison à la quantité d'eau non-structurale libérée en chauffant à 150°C (*cf.* figure III-62).

Pour aller plus loin, nous pouvons comparer la quantité de MTBSTFA utilisée lors de cette expérience pour la fonctionnalisation des acides aminés avec la quantité de MTBSTFA nécessaire pour réagir avec la totalité de l'eau éliminée à 150°C lors de l'analyse TG-DSC-MS (MID) et contenue dans 25 mg de sol.

Lors de la deuxième analyse TG-DSC-MS (MID) sur l'échantillon de Rio Tinto, nous avons observé une étape de perte de masse se terminant à 150°C et correspondant à une perte d'eau non-structurale. Lors de cette analyse, à 150°C, la masse de sol restante représente 88,71% de la masse initiale de sol, soit une masse perdue de 11,29% de la masse initiale. Pour une masse de sol de 25 mg, la masse de sol éliminée à 150°C est donc de $25 \times (11,29 / 100) = 2,8225$ mg. En admettant que la totalité de cette masse éliminée corresponde à de l'eau, à 150°C, pour 25 mg de sol, nous avons éliminé 2,8225 mg d'eau. La quantité de matière correspondante est calculée en divisant cette masse par la masse molaire de l'eau (18 g.mol^{-1}), soit $2,8225 / 18 = 0,16$ mmol, soit $0,16 \cdot 10^{-3}$ moles d'eau. Calculons maintenant la quantité de MTBSTFA nécessaire pour fonctionnaliser la totalité de l'eau éliminée à 150°C pendant l'analyse TG-DSC-MS et contenue dans 25 mg de sol. En premier lieu, il nous faut prendre en compte le fait qu'une molécule d'eau peut être silylée une ou deux fois (remplacement d'un seul hydrogène ou des deux), donnant pour produit de l'eau mono-silylée ou de l'eau bi-silylée, respectivement. Ces deux produits sont présents suite à la réaction de fonctionnalisation, et il existe un ratio eau mono-silylée sur eau bi-silylée, qui varie selon les conditions de l'expérience (Belmahdi, communication personnelle). Afin d'interpréter au mieux les résultats de ce calcul, nous nous placerons aux deux extrêmes de ce ratio. Prenons pour commencer le cas théorique où une mole d'eau réagit toujours avec deux moles de MTBSTFA, c'est-à-dire que 100% de l'eau fonctionnalisée est bi-silylée. Dans ce premier cas, puisqu'il faut deux moles de MTBSTFA pour fonctionnaliser une mole d'eau, la quantité de matière de MTBSTFA nécessaire pour fonctionnaliser la totalité de l'eau ($0,16 \cdot 10^{-3}$ moles) est de $0,16 \cdot 10^{-3} \times 2$, soit $0,32 \cdot 10^{-3}$ moles de MTBSTFA. Dans le deuxième cas théorique, une mole

d'eau réagit toujours avec une seule mole de MTBSTFA (100% de l'eau fonctionnalisée est mono-silylée). Dans ce cas, pour fonctionnaliser la totalité de l'eau ($0,16 \cdot 10^{-3}$ moles), la quantité de MTBSTFA nécessaire est de $0,16 \cdot 10^{-3}$ moles.

Le volume de MTBSTFA utilisé lors de l'expérience 1 (ainsi que lors de l'expérience 0) est de 120 μL . La masse du MTBSTFA en présence correspond au volume de MTBSTFA (0,12 mL) multiplié par la densité du MTBSTFA ($1,036 \text{ g.mL}^{-1}$), soit 0,12432 g de MTBSTFA. La quantité de matière de MTBSTFA en présence correspond à sa masse (0,12432 g) divisée par sa masse molaire (241 g.mol^{-1}), soit $5,16 \cdot 10^{-4}$ moles de MTBSTFA.

Or, cette quantité est inférieure à la quantité de MTBSTFA nécessaire pour fonctionnaliser la totalité de l'eau éliminée à 150°C pendant l'analyse TG-DSC-MS et contenue dans 25 mg de sol, que ce soit dans le premier cas théorique (100% de l'eau est bi-silylée, quantité de MTBSTFA nécessaire de $0,32 \cdot 10^{-3}$ moles) ou dans le deuxième cas théorique (100% de l'eau est mono-silylée, quantité de MTBSTFA nécessaire de $0,16 \cdot 10^{-3}$ moles). Ainsi, lors du chauffage du sol en présence de MTBSTFA, la totalité du MTBSTFA réagit avec de l'eau, expliquant les rendements nuls observés lors de l'expérience 0. Cependant, lors du pré-chauffage du sol à 150°C pendant 10 minutes, la totalité de l'eau éliminée à 150°C pendant l'analyse TG-DSC-MS est évaporée (au moins $0,16 \cdot 10^{-3}$ moles, puisque que le chauffage à 150°C pendant 10 minutes permet en théorie d'éliminer plus d'eau que la quantité éliminée à 150°C lors de l'analyse TG-DSC-MS), ce qui explique le fait que nous puissions détecter les acides aminés suite à ce pré-chauffage du sol (expérience 1).

Cependant, bien que nous ayons réussi à les détecter, le recouvrement n'est pas de 100% pour tous les acides aminés (les acides aminés concernés étant l'alanine, la glycine, la leucine, la proline, la méthionine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, l'acide aspartique, la lysine et l'histidine) (figure III-68). Un pré-chauffage plus long ou à une température plus importante que 150°C pendant 10 minutes serait peut-être nécessaire afin d'éliminer plus d'eau non-structurale de type porosité / adsorption / solvation pour pouvoir augmenter le rendement de fonctionnalisation, si ce type d'eau n'a pas été totalement éliminé lors de l'étape de pré-chauffage.

D'autres facteurs pourraient également expliquer ces recouvrements inférieurs à 100%.

Premièrement, le MTBSTFA pourrait réagir avec l'eau non-structurale de type eau de cristallisation des sulfates. En théorie, toute l'eau de cristallisation des sulfates n'a pas été éliminée par le préchauffage à 150°C pendant 10 minutes, puisque certains des sulfates de l'échantillon possèdent des étapes de déshydratation à des températures supérieures à 150°C. Par exemple, une copiapite analysée par August (1991) possède des étapes de déshydratation à des températures de 190, 240 et 340°C. L'alunogène et l'amarantite subissent également des déshydratations à des températures supérieures à 150°C : 320°C pour l'alunogène (August, 1991), et 192°C pour l'amarantite (Frost *et al.*, 2013). Il faudrait alors, pour expliquer les recouvrements inférieurs à 100%, que cette eau de cristallisation soit capable de réagir avec le MTBSTFA lors de son chauffage en présence du sol (75°C pendant 15 minutes). Ceci pourrait se faire de deux manières : soit alors qu'elle est encore incluse dans la structure des minéraux, soit parce qu'elle est libérée lors du chauffage à 75°C pendant 15 minutes. Ce dernier cas est cependant peu probable, puisque le pré-chauffage à 150°C pendant 10 minutes devrait pouvoir permettre l'élimination de toute l'eau de cristallisation qui pourrait être par la suite libérée lors du chauffage à 75°C pendant 15 minutes.

Il est également envisageable que toute l'eau non-structurale qui puisse désactiver le MTBSTFA ait été évaporée par le pré-chauffage à 150°C pendant 10 minutes, et qu'un autre facteur joue sur la diminution de rendement de la fonctionnalisation.

Il serait par exemple intéressant de déterminer si le MTBSTFA peut être désactivé en réagissant avec les groupements OH (eau structurale) présents dans les sulfates de l'échantillon de Rio Tinto en possédant: la jarosite $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, la copiapite $\text{Fe}_5[\text{OH}(\text{SO}_4)_3]_2 \cdot 20(\text{H}_2\text{O})$, voire l'amarantite (en effet, sa formule est parfois donnée comme étant : $\text{FeSO}_4\text{OH} \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ [*e.g.*, Stalport *et al.*, 2012]). Un autre facteur envisageable serait la désactivation du MTBSTFA par sa réaction avec de l'eau libérée par la déshydroxylation des sulfates. Il est cependant peu probable qu'à la température de chauffage du MTBSTFA en présence du sol (75°C), ce dernier soit désactivé de cette manière. En effet, les températures de première déshydroxylation des sulfates de l'échantillon sont toutes supérieures à 75°C. La déshydroxylation de la jarosite a été observée comme débutant à 130°C (Frost *et al.*, 2005), celle d'une copiapite à 340°C (August, 1991), et celle de l'amarantite à 550°C (Frost *et al.*, 2013) (l'alunogène ne possédant pas de groupements hydroxyles).

Un autre facteur de type oxydation du MTSBTFA lors de son chauffage en présence du sol semble peu envisageable, puisque cet échantillon ne comporte pas d'agents oxydants, tels

que des perchlorates, ou des oxydes de fer. En effet, l'échantillon est uniquement constitué de sulfates hydratés (Stalport *et al.*, 2012), et ne contient pas d'oxydes de fer au sens strict (*i.e.* constitués d'un cation métallique, le fer en l'occurrence, avec un oxygène pour anion; cf. Stanjek, 2003). Il serait cependant intéressant de considérer la possibilité que l'amarantite puisse posséder la qualité d'oxyde de fer, en plus de celle de sulfate hydraté. En effet, sa formule peut être écrite de la manière suivante: $\text{Fe}_2^{3+}(\text{SO}_4)_2\text{O}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (*e.g.*, Frost *et al.*, 2013). Encore faudrait-il démontrer sa capacité à oxyder le MTBSTFA.

Nous pourrions finalement envisager une potentielle réaction du MTBSTFA avec les anions sulfate SO_4^{2-} des quatre minéraux constituant l'échantillon (jarosite, copiapite, alunogène, et amarantite). Il faut cependant noter que Buch *et al.* (2006) ont montré que la fonctionnalisation des acides aminés était possible même en présence d'anions sulfate (concentration massique de 0 à 700 g.L⁻¹ de CaSO_4). Calculons la concentration massique en SO_4^{2-} correspondante à une concentration de 700 g.L⁻¹ de CaSO_4 . Pour un volume d'un litre de solution, la quantité de matière en CaSO_4 correspond à la masse de CaSO_4 (700 g), divisée par la masse molaire du CaSO_4 (136 g.mol⁻¹), ce qui équivaut à une quantité de matière de 5,15 moles de CaSO_4 . Une mole de CaSO_4 correspondant à une mole de SO_4^{2-} , la quantité de matière de SO_4^{2-} est de 5,15 moles. La masse de SO_4^{2-} en présence correspond à la quantité de matière de SO_4^{2-} (5,15 moles) multipliée par la masse molaire du SO_4^{2-} (96 g.mol⁻¹), ce qui équivaut à une masse de 494,4 g de SO_4^{2-} , donc une concentration massique en SO_4^{2-} de 494,4 g.L⁻¹. Même à cette concentration maximale, les auteurs n'ont pas observé d'influence des anions sulfate sur la fonctionnalisation des acides aminés.

Calculons maintenant, pour comparaison, la concentration massique en SO_4^{2-} présente lors de la fonctionnalisation des acides aminés pour notre expérience. Pour un gramme de sol de notre échantillon de Rio Tinto, nous avons 0,362 g de jarosite ; 0,116 g de copiapite ; 0,401 g d'alunogène ; et 0,12 g d'amarantite (Stalport *et al.*, 2012). Nous avons utilisé une masse de 0,025 g de sol. Commençons par calculer la masse de SO_4^{2-} contribué par chaque minéral de notre échantillon :

Jarosite, $\text{KFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$: un gramme de sol contenant 0,362 g de jarosite ; 0,025 g de sol contiendra 0,00905 g de jarosite. La quantité de matière de jarosite correspond à sa masse (0,00905 g) divisée par sa masse molaire (501 g.mol⁻¹), ce qui équivaut à une quantité de matière de $1,8\cdot 10^{-5}$ moles de jarosite. Une mole de jarosite correspondant à deux moles de SO_4^{2-} , la quantité de matière de SO_4^{2-} est de $3,6\cdot 10^{-5}$ moles. La masse de SO_4^{2-} contribué par

la jarosite correspond à la quantité de matière de SO_4^{2-} ($3,6 \cdot 10^{-5}$ moles) multipliée par la masse molaire du SO_4^{2-} ($96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une masse de $3,47 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ de SO_4^{2-} .

Copiapite, $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_4^{3+}(\text{SO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 20\text{H}_2\text{O}$: un gramme de sol contenant 0,116 g de copiapite ; 0,025 g de sol contiendra 0,0029 g de copiapite. La quantité de matière de copiapite correspond à sa masse (0,0029 g) divisée par sa masse molaire ($1250 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une quantité de matière de $2,32 \cdot 10^{-6}$ moles de copiapite. Une mole de copiapite correspondant à six moles de SO_4^{2-} , la quantité de matière de SO_4^{2-} est de $1,39 \cdot 10^{-5}$ moles. La masse de SO_4^{2-} contribué par la copiapite correspond à la quantité de matière de SO_4^{2-} ($1,39 \cdot 10^{-5}$ moles) multipliée par la masse molaire du SO_4^{2-} ($96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une masse de $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ de SO_4^{2-} .

Alunogène, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$: un gramme de sol contenant 0,401 g d'alunogène ; 0,025 g de sol contiendra 0,010025 g d'alunogène. La quantité de matière d'alunogène correspond à sa masse (0,010025 g) divisée par sa masse molaire ($648 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une quantité de matière de $1,55 \cdot 10^{-5}$ moles d'alunogène. Une mole d'alunogène correspondant à trois moles de SO_4^{2-} , la quantité de matière de SO_4^{2-} est de $4,64 \cdot 10^{-5}$ moles. La masse de SO_4^{2-} contribué par l'alunogène correspond à la quantité de matière de SO_4^{2-} ($4,64 \cdot 10^{-5}$ moles) multipliée par la masse molaire du SO_4^{2-} ($96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une masse de $4,45 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ de SO_4^{2-} .

Amarantite, $\text{Fe}_2^{3+}(\text{SO}_4)_2\text{O} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: un gramme de sol contenant 0,12 g d'amarantite ; 0,025 g de sol contiendra 0,003 g d'amarantite. La quantité de matière d'amarantite correspond à sa masse (0,003 g) divisée par sa masse molaire ($446 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une quantité de matière de $6,73 \cdot 10^{-6}$ moles d'amarantite. Une mole d'amarantite correspondant à deux moles de SO_4^{2-} , la quantité de matière de SO_4^{2-} est de $1,34 \cdot 10^{-5}$ moles. La masse de SO_4^{2-} contribué par l'amarantite correspond à la quantité de matière de SO_4^{2-} ($1,34 \cdot 10^{-5}$ moles) multipliée par la masse molaire du SO_4^{2-} ($96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui équivaut à une masse de $1,29 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ de SO_4^{2-} .

La masse totale de SO_4^{2-} contenue dans la masse de sol (0,025 g) correspond à l'addition de chacune des masses de SO_4^{2-} contribué par les différents sulfates de l'échantillon, soit $3,47 \cdot 10^{-3} + 1,34 \cdot 10^{-3} + 4,45 \cdot 10^{-3} + 1,29 \cdot 10^{-3}$, ce qui équivaut à une masse totale de $1,055 \cdot 10^{-2} \text{ g}$ de SO_4^{2-} dans cet échantillon de Rio Tinto de masse 0,025 g. La concentration massique du SO_4^{2-} correspond à sa masse ($1,055 \cdot 10^{-2} \text{ g}$) divisée par le volume de la solution (160 μL , soit $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ L}$), ce qui équivaut à une concentration massique de 65,94

g.L⁻¹. Cette concentration massique est inférieure à la concentration massique maximale (494,4 g.L⁻¹) utilisée par Buch *et al.* (2006) dans leur étude, concentration à laquelle la fonctionnalisation des acides aminés n'était pas affectée. Nous pouvons ainsi supposer qu'il est peu probable que la présence d'anions SO₄²⁻ soit à l'origine des recouvrements inférieurs à 100% lors de notre expérience 1.

Acide aminé	Référence		Rio Tinto 150°C 10 min			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	1,16	2,77	1,04	1,90	89,98	1,71
Glycine	0,89	3,77	0,56	8,66	63,09	5,46
Valine	1,37	2,56	1,35	1,61	99,11	1,59
Leucine	1,46	0,89	1,37	2,78	94,15	2,62
Isoleucine	1,56	2,88	1,58	2,21	101,51	2,24
Proline	1,30	1,63	1,04	2,94	79,84	2,35
Méthionine	1,35	1,45	1,29	2,53	95,87	2,42
Sérine	1,45	1,88	1,29	3,30	88,56	2,92
Thréonine	1,60	1,19	1,06	8,74	66,47	5,81
Phénylalanine	1,48	2,46	1,44	0,51	97,32	0,50
Acide aspartique	1,56	2,96	1,52	0,85	97,46	0,83
Acide glutamique	1,07	4,24	1,08	1,73	100,58	1,74
Lysine	0,64	2,14	0,23	16,51	36,26	5,99
Histidine	0,47	13,55	0,13	57,91	26,49	15,34
Tyrosine	1,56	4,55	1,55	2,53	99,36	2,51
Cystine	0,37	8,86	0,31	47,48	84,92	40,32

Tableau III-11: Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol de Rio Tinto chauffé à 150°C pendant 10 minutes. Le pourcentage de recouvrement, ainsi que son écart-type, est donné pour l'expérience sur le sol de Rio Tinto

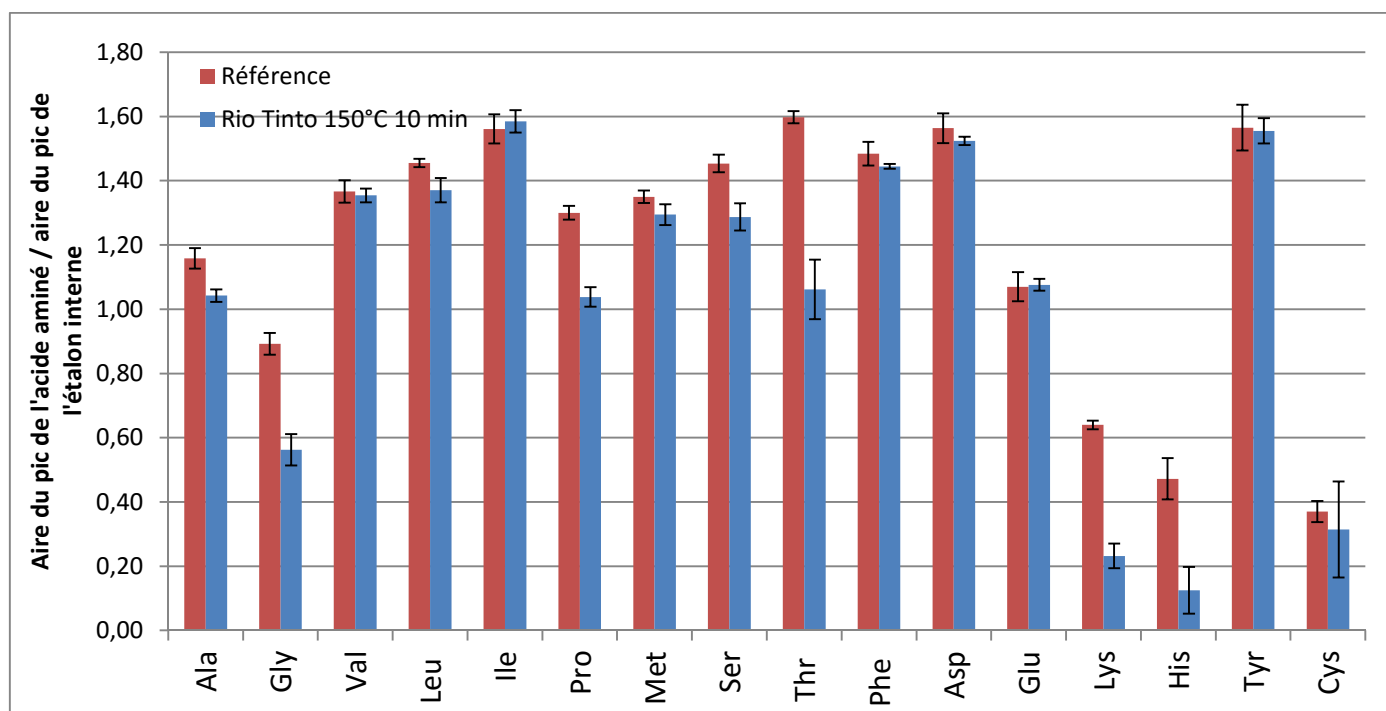


Figure III-67 : Quantité des acides aminés pour la référence et l'échantillon fonctionnalisé par le mélange de MTBSTFA/DMF précédemment chauffé en présence de Rio Tinto (qui lui a été chauffé au préalable à 150°C pendant 10 minutes).

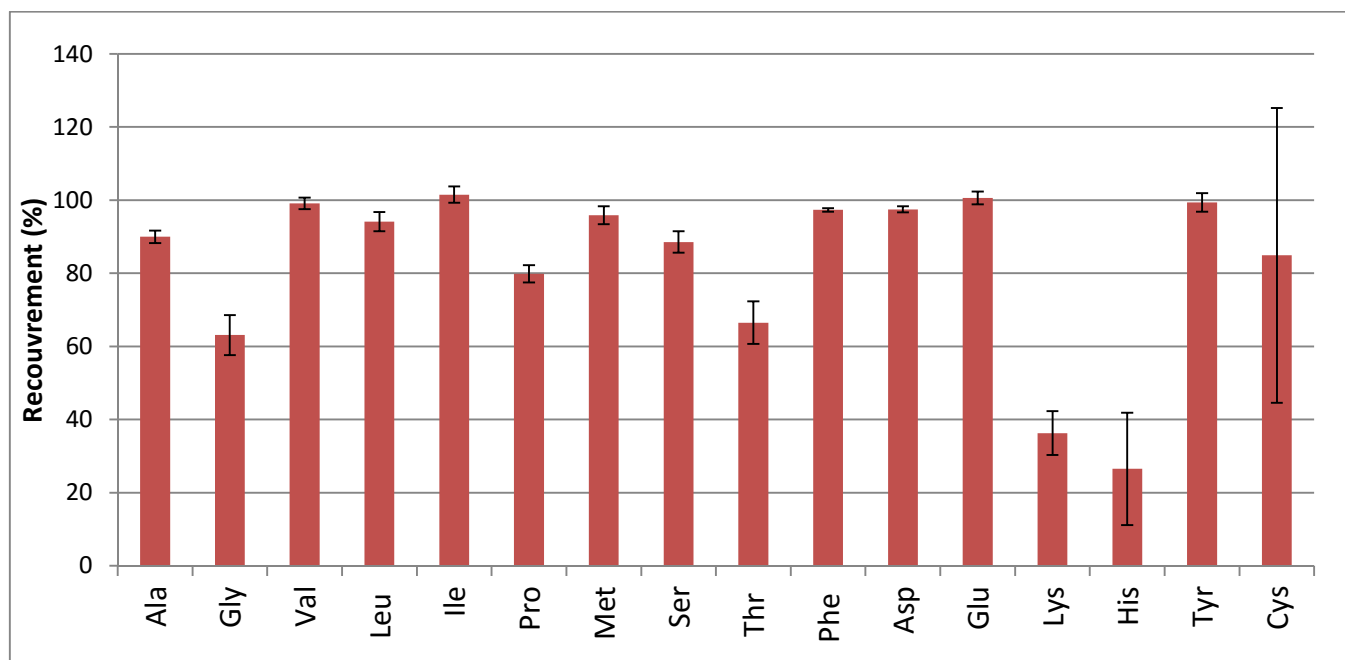


Figure III-68 : Pourcentages de recouvrement des acides aminés, par comparaison entre la référence et l'expérience

Il serait maintenant intéressant d'utiliser une quantité de sol moins importante (augmentation du ratio quantité de MTBSTFA sur la quantité de sol), sans chauffage préalable, afin de voir si la réduction de la quantité de matière d'eau permet de conserver une quantité de MTSBTFA permettant la détection des acides aminés.

3.5.2.1.2) Expérience 2 (sol non chauffé, ratio MTBSTFA / sol augmenté)

Hypothèse

L'hypothèse testée ici est qu'en augmentant le ratio de la quantité de MTBSTFA par rapport à la quantité de sol, la détection des acides aminés devient possible.

Protocole

Le protocole est le même que lors de l'expérience 1, sauf que cette fois le sol n'est pas chauffé au préalable. Une masse de sol de 10 mg est utilisée (à la place de 25 mg). Un mélange de MTBSTFA/DMF (30 et 90 μ L, respectivement, donc un volume total de réactif de 120 μ L, correspondant à un ratio DMF : MTBSTFA de 1 : 3) y est ajouté, le tout est mélangé grâce à un vortex. La suite du protocole est la même que pour l'expérience 1.

Résultats

Les acides aminés sont bien détectés (tableau III-12, figure III-69). L'inhibition de la fonctionnalisation peut donc également être évitée en augmentant le ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol. Il est donc possible d'utiliser une quantité de matière de MTBSTFA en excès par rapport à l'espèce présente dans l'échantillon de sol de Rio Tinto, qui avait entraîné la désactivation du MTBSTFA lors de notre test préliminaire en partie 1 de ce chapitre.

Cependant, cette méthode est moins efficace que le chauffage préalable du sol pendant 10 minutes à 150°C (figure III-70). En effet, le recouvrement de la cystine et de

l'histidine sont de zéro, et les recouvrements de l'acide aspartique, acide glutamique, lysine et tyrosine sont réduits (figure III-70).

Peut-être que le ratio employé ne permet pas de conserver assez de MTBSTFA (suite au chauffage en présence du sol) pour fonctionnaliser les acides aminés. Pour vérifier, il faudrait encore augmenter le ratio quantité de MTBSTFA par rapport à la quantité de sol.

Nous pouvons cependant comparer la quantité de MTBSTFA utilisée lors de cette expérience avec la quantité de MTBSTFA nécessaire pour réagir avec la totalité de l'eau éliminée à 150°C lors de l'analyse TG-DSC-MS (MID) et contenue dans 10 mg de sol. A 150°C, l'analyse TG-DSC-MS (MD) nous montre qu'un pourcentage de 11,29 % de la masse de ce sol est éliminé. En admettant que la totalité de cette masse corresponde à de l'eau, la masse d'eau correspondante est de $10 \times (11,29 / 100)$, soit 1,129 mg d'eau. La quantité de matière de cette eau correspond à la masse divisée par la masse molaire de l'eau, soit $1,129 / 18 = 6,27 \cdot 10^{-3}$ mmol, soit $6,27 \cdot 10^{-5}$ mol. Une mole d'eau réagissant avec 2 moles de MTBSTFA, afin de fonctionnaliser toute cette eau, il faut une quantité de MTBSTFA de $6,27 \cdot 10^{-5} \times 2 = \underline{1,254 \cdot 10^{-4} \text{ mol}}$. Le volume de MTBSTFA utilisé lors de l'expérience 2 est de 90 µL. La masse du MTBSTFA en présence correspond au volume de MTBSTFA (0,09 mL) multiplié par la densité du MTBSTFA ($1,036 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), soit 0,09324 g de MTBSTFA. La quantité de matière de MTBSTFA en présence correspond à sa masse (0,09324 g) divisée par sa masse molaire ($241 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), soit $\underline{3,87 \cdot 10^{-4} \text{ moles}}$ de MTBSTFA. Or, cette quantité utilisée est supérieure à la quantité de MTBSTFA nécessaire pour fonctionnaliser la totalité de l'eau éliminée à 150°C lors de l'analyse TG-DSC-MS et contenue dans 10 mg de sol : $6,27 \cdot 10^{-5}$ moles d'eau ; soit $\underline{1,254 \cdot 10^{-4} \text{ moles}}$ de MTBSTFA nécessaires dans le cas où 100% de l'eau fonctionnalisée est bi-silylée, et $\underline{6,27 \cdot 10^{-5} \text{ moles}}$ de MTBSTFA nécessaires dans le cas où 100% de l'eau fonctionnalisée est mono-silylée. Ainsi, même sans chauffage préalable du sol, avec un ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol augmenté (par rapport à l'expérience 1), il reste assez de MTBSTFA suite à son chauffage en présence du sol (et sa réaction avec l'eau) pour pouvoir fonctionnaliser les acides aminés, ce qui confirme le résultat de l'expérience 2.

Acide aminé	Référence		Rio Tinto, ratio MTBSTFA/sol augmenté			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	1,16	2,77	1,00	18,09	86,77	15,69
Glycine	0,89	3,77	0,65	22,39	72,62	16,26
Valine	1,37	2,56	1,46	8,02	107,01	8,58
Leucine	1,46	0,89	1,45	5,61	99,31	5,57
Isoleucine	1,56	2,88	1,53	4,40	97,74	4,30
Proline	1,30	1,63	1,19	14,25	91,33	13,01
Méthionine	1,35	1,45	1,33	6,14	98,65	6,05
Sérine	1,45	1,88	1,18	9,36	81,11	7,59
Thréonine	1,60	1,19	1,09	7,44	68,28	5,08
Phénylalanine	1,48	2,46	1,46	6,59	98,16	6,46
Acide aspartique	1,56	2,96	1,37	6,19	87,68	5,43
Acide glutamique	1,07	4,24	0,90	10,37	83,72	8,69
Lysine	0,64	2,14	0,08	66,49	8,41	8,39
Histidine	0,47	13,55	0,00	N/A	0,00	N/A
Tyrosine	1,56	4,55	0,99	16,44	63,41	10,43
Cystine	0,37	8,86	0,00	N/A	0,00	N/A

Tableau III-12 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol de Rio Tinto, non chauffé, avec un ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol augmenté. Le pourcentage de recouvrement, ainsi que son écart-type, est donné pour l'expérience sur le sol de Rio Tinto.

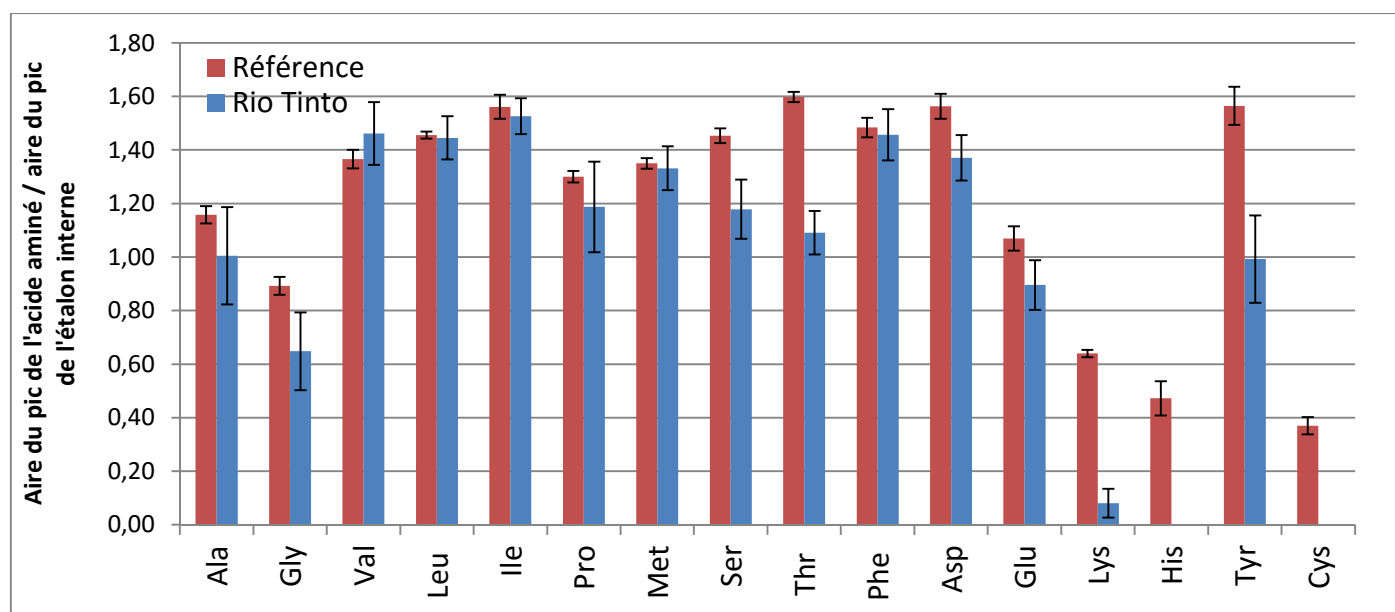


Figure III-69: Quantité des acides aminés pour la référence et l'échantillon fonctionnalisé par le mélange de MTBSTFA/DMF précédemment chauffé en présence de Rio Tinto. Le ratio de la quantité de MTBSTFA sur la quantité de sol a été augmenté.

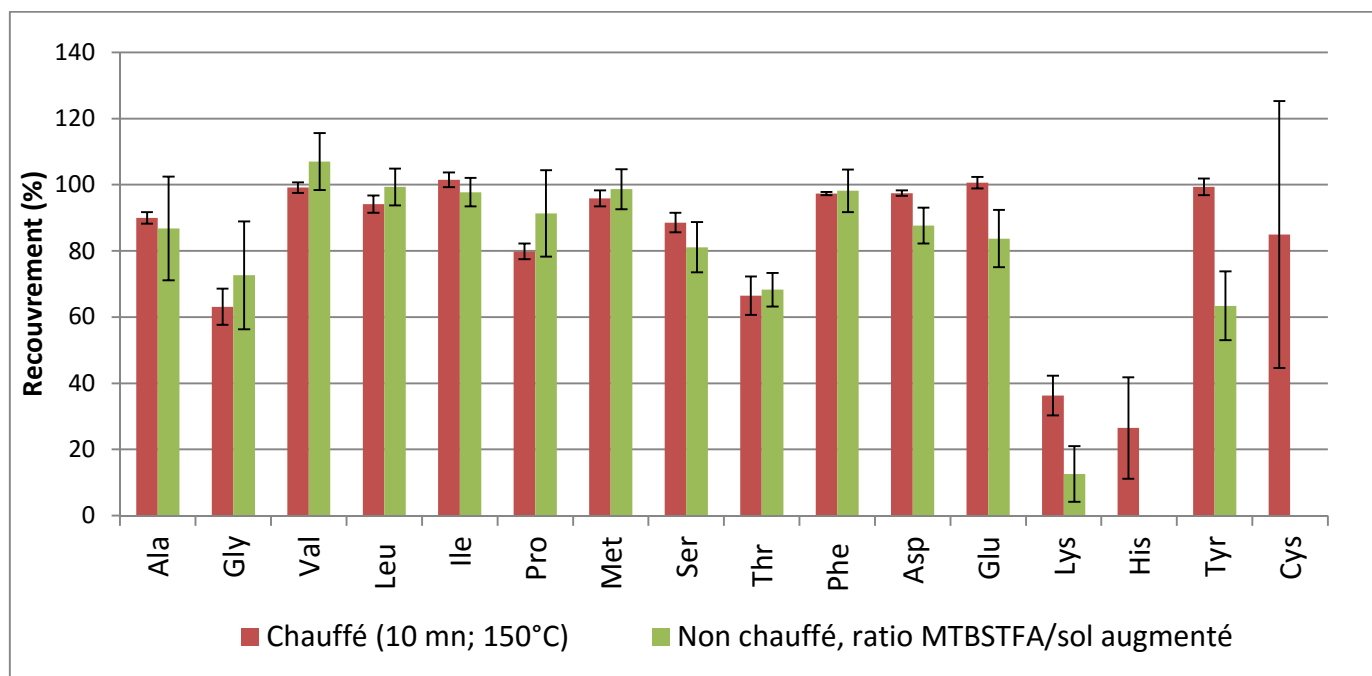


Figure III-70 : Pourcentages de recouvrement des acides aminés, par comparaison entre la référence et l'expérience

3.5.2.1.3) Expérience 3 (sol chauffé, 15 min. @ 75°C)

Hypothèse

Le chauffage à 150°C ne permet pas de différencier entre l'eau non-structurale de type eau de porosité / eau adsorbée / eau de solvation ; et l'eau non-structurale relâchée par la déshydratation des sulfates hydratés (eau de cristallisation, $\cdot n(\text{H}_2\text{O})$). En effet, la perte de cette eau non-structurale de cristallisation (c'est-à-dire la déshydratation des sulfates) peut se dérouler à des températures inférieures à 150°C pour certains sulfates. Par exemple, elle a été observée à 85°C (Molony et Ridge, 1968) et à 90,5°C (Ostroff, 1964) pour le gypse $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, et à 90°C pour les sulfates d'aluminium hydratés (Bai *et al.*, 2010). Et en effet, lors d'études portant sur des minéraux similaires à ceux présents dans notre échantillon de Rio Tinto, les températures de première déshydratation observées sont les suivantes : 78°C pour

l'amarantite (Frost *et al.*, 2013), 115°C pour l'alunogène (August, 1991), et 130°C pour la copiapite (August, 1991). La jarosite, quant à elle, ne possède pas d'eau de cristallisation (formule $\text{KFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$).

En chauffant à 75°C on élimine donc en théorie seulement les autres types d'eau non-structurale de l'échantillon: celle des pores du sol, celle adsorbée sur la surface des grains, et celle formant une couche de solvation autour des grains (en pratique, ce n'est pas si bien délimité, car en chauffant à 75°C on doit quand même commencer à déshydrater les sulfates, notamment l'amarantite). Grâce à cette expérience, on peut donc vérifier si c'est l'eau non structurale de type porosité / adsorbée / solvation, ou l'eau non-structurale $n(\text{H}_2\text{O})$ (eau de cristallisation) qui est responsable de la non-détection des acides aminés.

Protocole

Le protocole utilisé est strictement le même que pour l'expérience 1, sauf que l'étape de chauffage préalable du sol est de 15 minutes à 75°C.

Résultats

En chauffant au préalable à 75°C pendant 15 minutes, on détecte toujours les acides aminés (tableau III-13, figure III-71). Nous pouvons donc affirmer que l'eau non-structurale de type porosité / adsorbée / solvation est en grande partie responsable de la non-détection des acides aminés.

Pour aller plus loin, nous pouvons comparer la quantité de MTBSTFA utilisée lors de cette expérience avec la quantité de MTBSTFA nécessaire pour réagir avec la totalité de l'eau éliminée à 75°C lors de l'analyse TG-DSC-MS (MID) et contenue dans 25 mg de sol.

Lors de l'analyse TG-DSC-MS (MID) sur Rio Tinto, à 75°C, la masse de sol éliminée représente 1,24 % de la masse initiale. Ainsi, pour une masse de sol de 25 mg, à 75°C, on aura éliminé $25 \times (1,24 / 100) = 0,31$ mg. En considérant que la totalité de cette masse correspond à de l'eau, la masse d'eau éliminée à 75°C est de 0,31 mg. La quantité de matière de cette eau correspond à la masse (0,31 mg) divisée par la masse molaire de l'eau, soit $0,31 / 18 = 1,72 \cdot 10^{-2}$ mmol, soit $1,72 \cdot 10^{-5}$ mol. Si l'on considère qu'une mole d'eau réagit avec 2 moles de MTBSTFA (100% de l'eau fonctionnalisée est bi-silylée), afin de fonctionnaliser la totalité cette

eau, il faut une quantité de MTBSTFA de $1,72.10^{-5} \times 2 = \underline{3,44.10^{-5} \text{ mol}}$. Si l'on considère qu'une mole d'eau réagit avec une seule mole de MTBSTFA (100% de l'eau fonctionnalisée est mono-silylée), la quantité de MTBSTFA nécessaire sera de $\underline{1,72.10^{-5} \text{ moles}}$. Or, ces deux quantités sont inférieures à la quantité de MTBSTFA en présence ($\underline{5,16.10^{-4} \text{ mol}}$). Ainsi, en pré-chauffant le sol à 75°C pendant 15 minutes, la totalité de l'eau éliminée à 75°C pendant l'analyse TG-DSC-MS est évaporée, et nous avons éliminé assez d'eau (au moins $1,72.10^{-5} \text{ moles}$, puisque que la chauffage à 75°C pendant 15 minutes permet en théorie d'éliminer plus d'eau que la quantité éliminée à 75°C lors de l'analyse TG-DSC-MS) pour que la totalité du MTBSTFA ne réagisse pas avec cette eau lors de son chauffage en présence du sol, et qu'il en reste une quantité suffisante pour la fonctionnalisation des acides aminés, ce qui confirme le résultat de l'expérience 3. Le fait que la quantité de MTBSTFA nécessaire pour réagir avec la totalité de l'eau évaporée à 75°C et contenue dans 25 mg de sol soit inférieure à la quantité de MTBSTFA utilisée pourrait laisser penser que l'on pourrait détecter les acides aminés sans chauffage préalable du sol, ce qui n'est pas le cas (résultat de l'expérience 0). Ceci est probablement dû au fait que lors du pré-chauffage à 75°C pendant 15 minutes, on élimine plus d'eau que ce qui est éliminé à 75°C lors de l'analyse TG-DSC-MS. Afin de connaître la quantité d'eau exacte éliminée par le chauffage à 75°C pendant 15 minutes, il aurait fallu mesurer la masse d'un échantillon de Rio Tinto avant et après chauffage à 75°C pendant 15 minutes.

Cependant, ce protocole de chauffage (75°C pendant 15 minutes) est moins efficace que celui à 150°C pendant 10 minutes. En effet, les écart-types sont plus importants, le recouvrement pour la lysine est plus faible, et les recouvrements pour la cystine et l'histidine sont nuls (figure III-72).

Ceci nous empêche de conclure avec certitude que la présence d'eau non-structurale de type porosité / adsorbée / solvation est l'unique responsable de la non-détection des acides aminés. En effet, l'efficacité supérieure du chauffage à 150°C pendant 10 minutes pourrait provenir soit d'une plus grande quantité d'eau structurale de type porosité / adsorbée / solvation évaporée ; soit d'un autre facteur. Un tel facteur pourrait être l'élimination d'eau non-structurale de type eau de cristallisation $n(\text{H}_2\text{O})$, prenant place en théorie lors du pré-chauffage de l'expérience 1 (150°C pendant 10 minutes) mais pas pendant celui de l'expérience 3 (75°C pendant 15 minutes), puisque les températures de première déshydratation des sulfates de l'échantillon sont toutes comprises entre 75 et 150°C : 78°C

pour l'amarantite (Frost *et al.*, 2013), 115°C pour l'alunogène (August, 1991), et 130°C pour la copiapite (August, 1991) (la jarosite ne possédant pas d'eau de cristallisation) (l'amarantite, cependant, pourrait subir une déshydratation lors du pré-chauffage à 75°C pendant 15 minutes, puisque sa déshydratation commence à 78°C, *cf.* Frost *et al.*, 2013). Pour que cette hypothèse soit valide, il faudrait que cette eau de cristallisation soit disponible pour réagir avec le MTBSTFA lors de son chauffage en présence du sol à 75°C pendant 15 minutes, soit alors qu'elle est toujours cristallisée au sein de la structure des sulfates hydratés, soit parce qu'elle commence déjà à être libérée par un chauffage à 75°C pendant 15 minutes et réagit avec le MTBSTFA (il faudrait pour cela que le pré-chauffage à 75°C pendant 15 minutes n'ait pas éliminé toute l'eau de cristallisation libérable à cette température, pour qu'il en reste lors du chauffage du MTBSTFA en présence du sol à 75°C pendant 15 minutes). Ainsi, l'élimination de l'eau de cristallisation des sulfates lors du pré-chauffage à 150°C pendant 10 minutes pourrait être un des facteurs conduisant aux recouvrements supérieurs de l'expérience 1 par rapport à l'expérience 3. Finalement, ce recouvrement supérieur pourrait également être expliqué par le fait que le pré-chauffage à 150°C permette de commencer à déshydroxyler les sulfates (contrairement au pré-chauffage à 75°C), notamment la jarosite, pour laquelle une déshydroxylation a été observée dès 130°C (Frost *et al.*, 2005). Cette hypothèse impliquerait que lors du chauffage du MTBSTFA en présence du sol (75°C pendant 15 minutes), le MTBSTFA soit désactivé par sa réaction avec les groupements hydroxyle des sulfates (qui seraient donc moins nombreux après un pré-chauffage à 150°C pendant 10 minutes qu'à 75°C pendant 15 minutes).

Acide aminé	Référence		Rio Tinto 75°C 15 min			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	1,16	2,77	1,12	20,40	96,64	19,72
Glycine	0,89	3,77	0,63	12,58	70,21	8,84
Valine	1,37	2,56	1,49	24,67	109,43	26,99
Leucine	1,46	0,89	1,49	28,66	102,14	29,27
Isoleucine	1,56	2,88	1,61	28,74	103,17	29,65
Proline	1,30	1,63	1,09	21,94	84,20	18,47
Méthionine	1,35	1,45	1,45	24,35	107,17	26,10
Sérine	1,45	1,88	1,48	34,36	102,08	35,08
Thréonine	1,60	1,19	1,43	36,12	89,22	32,22
Phénylalanine	1,48	2,46	1,60	27,52	108,12	29,76
Acide aspartique	1,56	2,96	1,58	29,86	100,93	30,13
Acide glutamique	1,07	4,24	1,04	29,25	97,37	28,48
Lysine	0,64	2,14	0,11	45,02	17,36	7,82
Histidine	0,47	13,55	0,00	N/A	0,00	N/A
Tyrosine	1,56	4,55	1,28	42,45	81,63	34,65
Cystine	0,37	8,86	0,00	N/A	0,00	N/A

Tableau III-13 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol de Rio Tinto, non chauffé, avec un ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol augmenté. Le pourcentage de recouvrement, ainsi que son écart-type, est donné pour l'expérience sur le sol de Rio Tinto.

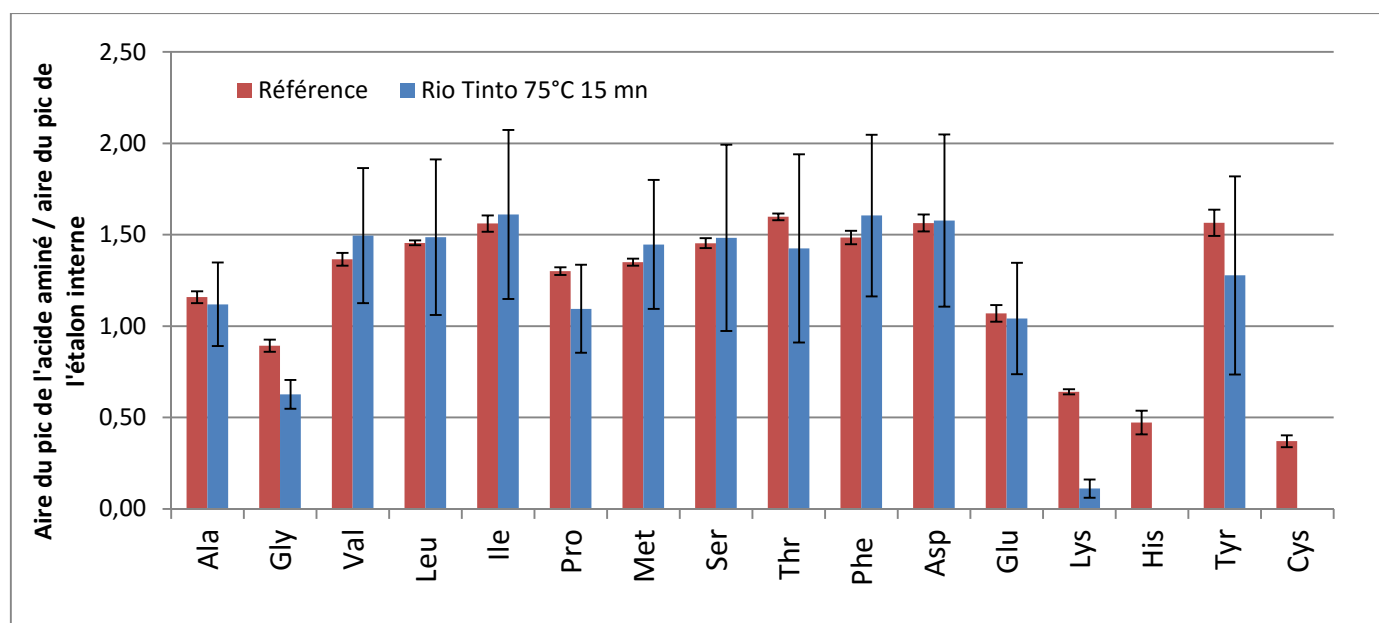


Figure III-71: Quantité des acides aminés pour la référence et l'échantillon fonctionnalisé par le mélange de MTBSTFA/DMF précédemment chauffé en présence de Rio Tinto. L'échantillon de Rio Tinto a été au préalable chauffé pendant 15 minutes à 75°C.

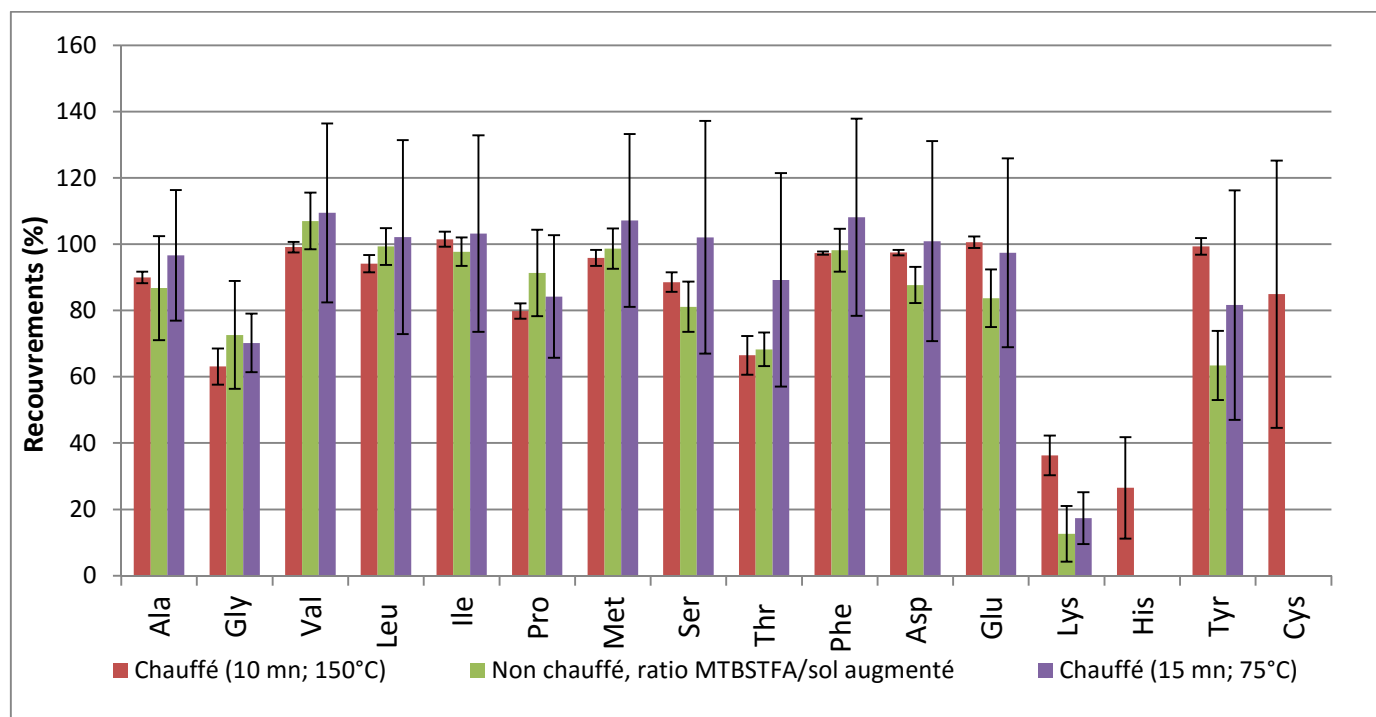


Figure III-72: Pourcentages de recouvrement des acides aminés, par comparaison entre la référence et l'expérience

3.5.2.1.4) Conclusion et perspectives

L'élimination de l'eau non-structurale de type porosité / adsorbée / solvation (par chauffage à 75°C pendant 15 minutes) suffit à détecter les acides aminés. Ce type d'eau semble donc contribuer grandement à la réduction du rendement de la fonctionnalisation, par désactivation chimique du MTBSTFA lors de son chauffage en présence du sol (plus précisément, le MTBSTFA réagit avec l'eau et n'est plus disponible par la suite pour fonctionnaliser les acides aminés). Cependant, le chauffage à 150°C pendant 10 minutes est plus efficace, permettant la détection d'un plus grand nombre d'acides aminés, améliorant le recouvrement de la lysine, et réduisant les écart-types. Une explication serait que ce chauffage permette d'éliminer une quantité d'eau non-structurale de type porosité / adsorbée / solvation plus importante. Alternativement, le chauffage à 150° pendant 10 minutes

pourrait permettre, contrairement au chauffage à 75°C pendant 15 minutes, l'élimination d'eau non-structurale de type $n(\text{H}_2\text{O})$ (eau de cristallisation). Nous ne pouvons donc pas écarter la possibilité que ce type d'eau soit également responsable de la diminution du rendement de la fonctionnalisation observé lors de l'expérience 3. Cela impliquerait que lors d'un chauffage à 75°C pendant 15 minutes, l'eau non-structurale de type cristallisation $n(\text{H}_2\text{O})$ soit disponible pour réagir avec le MTBSTFA (soit sous sa forme cristallisée au sein de la structure des sulfates ; soit car un chauffage isotherme de 15 minutes à 75°C apporterait assez d'énergie pour commencer à libérer ce type d'eau, ce qui pourrait être le cas en particulier pour l'amarantite). Finalement, le rendement supérieur de l'expérience 1 par rapport à l'expérience 3 pourrait s'expliquer par le fait que le pré-chauffage à 150°C (par comparaison avec celui à 75°C) permette d'éliminer une plus grande quantité d'eau structurale OH (dans ce cas, cela impliquerait que le MTBSTFA puisse réagir avec les groupements hydroxyles des sulfates alors qu'ils sont inclus dans la structure des minéraux).

Tous ces résultats sont d'importance pour la recherche d'indices de vie sur Mars. En effet, nous avons choisi dans cette thèse de considérer l'eau comme pouvant appartenir à deux catégories : l'eau structurale (groupements OH des minéraux), et l'eau non-structurale (eau de porosité / adsorbée / solvatation ; ainsi que l'eau de cristallisation ; et l'eau inter-feuillets). Or, ces deux catégories d'eau sont présentes sur Mars. En effet, des minéraux contenant des groupements OH ont été détectés (par exemple l'akaganéite; cf. Ming *et al.*, 2014; Vaniman *et al.*, 2014). De plus, de l'eau non-structurale a été observée : eau libre (c'est à dire non liée au sein de minéraux, n'incluant donc pas l'eau de cristallisation ou l'eau inter-feuillets) sous forme solide (Smith *et al.*, 2009) (la formation temporaire d'eau libre et liquide étant également possible dans les conditions régnant sein du cratère Gale, cf. Martín-Torres *et al.*, 2015), mais aussi eau de cristallisation, notamment au sein de sulfates hydratés, comme la bassanite, détectée lors de l'analyse d'une roche sédimentaire de la baie de Yellowknife, cratère Gale (cf. Ming *et al.*, 2014; Vaniman *et al.*, 2014). De l'eau inter-feuillets pourrait également être présente au sein de phyllosilicates (par exemple, cf. Vaniman *et al.*, 2014). Finalement, de la jarosite, un des sulfates constituant notre échantillon de Rio Tinto, a été détectée sur Mars, notamment *in situ* par les spectromètres Mössbauer et mini-TES d'Opportunity, au sein d'affleurements sédimentaires de Meridiani Planum (Squyres *et al.*, 2004).

En appliquant un pré-traitement du régolithe martien par chauffage, on pourrait donc non seulement y trouver des molécules organiques (en vaporisant l'eau non structurée de type porosité / adsorbée / solvatation, s'il y en a ; par chauffage à 75°C pendant 15 minutes), mais également augmenter le rendement de fonctionnalisation (en éliminant l'eau de cristallisation des sulfates, et/ou en apportant plus d'énergie pour l'élimination de l'eau non-structurée de type porosité / adsorbée / solvatation, et/ou en commençant à éliminer de l'eau structurée, par chauffage à 150°C pendant 10 minutes).

De plus, ces résultats sont également d'intérêt pour la recherche de molécules organiques dans d'autres environnements extraterrestres via la fonctionnalisation au MTBSTFA. En effet, des sols avec des concentrations en humidité supérieures à 0,4% pourraient être trouvés dans des environnements extraterrestres (Biemann *et al.*, 1977, dans Rodier *et al.*, 2001). Ainsi, un pré-traitement du sol par chauffage à des températures permettant l'évaporation de l'eau non-structurée de type porosité / adsorbée / solvatation pourrait permettre la détection de molécules organiques qui seraient sinon restées non détectées.

Il est également intéressant de noter que même en chauffant à 150°C pendant 10 minutes, les recouvrements ne sont toujours pas tous de 100%. Une explication serait que l'énergie apportée par le chauffage n'ait pas été suffisante pour éliminer la totalité de l'eau non-structurée de type porosité /adsorption / solvatation entraînant la diminution du rendement de la fonctionnalisation, ou bien qu'un autre facteur entre en jeu. Par exemple, le MTBSTFA pourrait réagir avec de l'eau de cristallisation (si elle n'a pas été entièrement éliminée lors du pré-chauffage à 150°C), ce qui impliquerait que cette eau soit capable de réagir avec le MTBSTFA alors qu'elle est toujours présente dans la structure des sulfates, ou bien qu'elle soit libérée sous l'effet du chauffage lors de la fonctionnalisation des acides aminés (75°C pendant 15 minutes). Alternativement, l'eau structurée pourrait être un autre facteur à l'origine des recouvrements inférieurs à 100%, de manière similaire au cas de l'eau de cristallisation, si les groupements OH des sulfates peuvent réagir avec le MTBSTFA alors qu'ils sont inclus dans la structure des minéraux.

Dans le cas où les groupements OH des sulfates auraient un impact sur le rendement de la fonctionnalisation, il faudrait chauffer à une température plus importante au préalable pour les déshydroxyler, mais il faudrait faire attention de ne pas commencer à dégrader ou

vaporiser la matière organique potentiellement présente dans le sol. En effet, pour donner quelques exemples, Yablokov *et al.* (2009) ont observé au cours de leur étude que la décomposition de la glycine débutait à 210°C (température inférieure à son point de fusion, qui est de 262°C), 240°C pour l’alanine (point de fusion de 297°C), et 200°C pour la sérine (point de fusion de 228°C). Les températures de décomposition de certains acides aminés avaient été également déterminées par Dunn et Brophy (1932): 289 à 292°C (glycine), 247 à 249°C (acide D-glutamique), 225 à 227°C (acide DL-glutamique), 342 à 344°C (L-tyrosine), 297°C (DL-alanine), 318 à 320°C (DL-phénylalanine), 278 à 280°C (DL-acide aspartique). Des températures de décomposition supplémentaires, déterminées par d’autres auteurs, sont données dans le tableau 1 de la publication de Dunn et Brofy (1932). A titre de comparaison, voici différentes températures de déshydroxylation observées au cours de diverses études sur des minéraux similaires à ceux constituant Rio Tinto : 130 – 330°C (jarosite de potassium ; Frost *et al.*, 2005), 550°C (amarantite ; Frost *et al.*, 2013), 340 et 540°C (copiapite ; August, 1991) (l’alunogène ne possédant pas de groupements hydroxyles). Ainsi, la dégradation des acides aminés serait inévitable si l’on voulait réaliser la déshydroxylation complète des sulfates de l’échantillon de Rio Tinto. Dans le cas d’un échantillon composé majoritairement de jarosite, la déshydroxylation du minéral sans dégradation associée des acides aminés pourrait être réalisable, puisqu’il est possible de commencer à déshydroxyler ce minéral à partir de 130°C (Frost *et al.*, 2005). Il faudrait tout d’abord réaliser les mêmes tests que ce que nous avons fait (avec chauffage et sans chauffage préalable de la matrice minérale), mais sur un échantillon de jarosite pure, afin que la seule eau présente dans l’échantillon soit de l’eau structurale sous forme OH.

Nous avons également montré que le fait d’utiliser du MTBSTFA en excès (augmentation du ratio quantité de MTSBTFA / quantité de sol) permet de détecter les acides aminés, même si cette technique est elle aussi qualitativement et quantitativement moins efficace qu’un chauffage préalable du sol à 150°C pendant 10 minutes.

La meilleure combinaison pour une recherche de molécule organiques *in situ* dans un sol contenant des sulfates hydratés serait alors probablement de chauffer à une température de l’ordre de 150°C (permettant d’éliminer l’eau non-structurale, qu’elle soit de type porosité

/ adsorbée / solvatation ou de type eau de cristallisation $n(\text{H}_2\text{O})$), et de rajouter du MTBSTFA en excès.

Dans ce cas on pourrait peut-être atteindre des rendements de 100% sans avoir recours à un chauffage à des températures plus élevées, températures permettant de déshydroxyler les sulfates (au cas où les groupements OH dans la structure des sulfates posent vraiment problème, ce dont nous ne pouvons être sûr avant d'avoir réalisé de nouvelles expériences, par exemple sur de la jarosite pure). Ceci serait avantageux, car des températures plus élevées pourraient, comme précisé ci-dessus, entraîner la dégradation thermique ou la vaporisation des molécules organiques recherchées dans le sol martien. Le chauffage à 150°C n'entraînerait pas la dégradation des acides aminés, cependant il pourrait entraîner la vaporisation d'autres composés organiques cibles. L'acide acétique, par exemple, considéré comme possiblement présent sur Mars (en tant qu'intermédiaire métastable de l'oxydation de potentielles molécules organiques originellement présentes sur la planète ; cf. Benner *et al.*, 2000), possède une température d'ébullition de 117,9°C (Haynes, 2013).

3.5.2.2) Sol dopé

3.5.2.2.1) Expérience 4 (sol non chauffé, « SAM-like »)

Hypothèse

Grâce à cette expérience, nous avons voulu nous placer dans les conditions de l'expérience SAM, en reproduisant à la fois la concentration en acides aminés optimiste présente dans le sol martien, et un ratio MTBSTFA : DMF similaire à celui présent dans les capsules de fonctionnalisation au sein de SAM (ratio de 4 : 1). Le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol est plus élevé encore que celui qui a permis de détecter les acides aminés sans étape préalable de chauffage du sol (expérience 2).

Explication du ratio DMF : MTBSTFA « SAM-like » : Les capsules de « wet chemistry » de SAM sont au nombre de 9, et 7 sont dédiées à la fonctionnalisation au MTBSTFA. Ces

capsules contiennent chacune un volume total de 500 μL , soit 400 μL de MTBSTFA et 100 μL de DMF (ratio DMF : MTBSTFA de 1 : 4).

Explication de la quantité d'acides aminés choisie pour doper le sol : Au cours de sa thèse, Caroline Freissinet (Freissinet, 2010) a déterminé des concentrations d'acides aminés (pour chaque acide aminé) pessimistes et optimistes dans le sol martien, de 0,0035 et 1,39 ppm, respectivement.

Prenons la quantité optimiste. 1,39 ppm correspondent à $1,39 \cdot 10^{-6}$ moles par gramme de sol martien, c'est-à-dire $1,39 \cdot 10^{-8}$ moles pour 10 mg de sol (la quantité de sol que nous souhaitons doper pour cette expérience, afin d'avoir un ratio « quantité de réactif / quantité de sol » supérieur ou égal à celui qui avait permis de détecter les acides aminés sans chauffage préalable de Rio Tinto). Or, la concentration de la solution standard d'acides aminés utilisée est de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Ainsi, le volume de solution standard à prélever pour doper Rio Tinto afin d'avoir une quantité optimiste d'acides aminés attendue sur Mars est le suivant :

$$V = \frac{n}{C} = \frac{1,39 \cdot 10^{-8}}{2,5 \cdot 10^{-3}} = 5,56 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 5,56 \mu\text{L}$$

Avec n : quantité de matière en acides aminés (mol), C : concentration en acides aminés de la solution ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), et V : volume à ajouter au sol pour dopage (L).

Protocole

Le protocole de dopage est inspiré des protocoles utilisés par Buch *et al.* (2009, 2006, 2003), en particulier l'évaporation à 40°C (Buch *et al.*, 2003). Le protocole de dopage utilisé est le suivant : le volume de solution d'acides aminés désiré (5,56 μL pour cette expérience) est ajouté dans un vial contenant déjà l'échantillon de sol (ce dernier est sous forme de poudre et a été ajouté au vial au préalable). Après ajout de la solution d'acides aminés au sol, le vial est agité grâce à un vortex, puis placé sous flux constant d'argon à 40°C. Au bout d'une heure, l'évaporation est arrêtée. Le sol forme alors une croûte sèche qui adhère au fond du vial. Cette croûte est décollée de la paroi du vial à l'aide d'une fine tige métallique pointue, puis les paillettes de sol en résultant sont broyées (grâce à l'introduction d'une tige en verre dans le vial), jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Le pilulier est de nouveau placé à évaporer

sous flux constant d'argon à 40°C, pendant 30 minutes. La tige en métal et la tige en verre ont au préalable été nettoyées par des lavages successifs à l'eau millipure, éthanol et acétone.

Pour cette expérience, nous avons dopé, par réalisation du protocole décrit ci-dessus, 10 mg de l'échantillon de Rio Tinto avec un volume de 5,56 µL de la solution standard d'acides aminés. Le sol est ensuite fonctionnalisé (75°C, 15 min) avec un mélange pur de MTBSTFA/DMF (120 et 30 µL, respectivement, donc un volume total de réactif de 150 µL, correspondant à un ratio DMF : MTBSTFA de 1 : 4). Ensuite, le fonctionnalisat est injecté pour analyse par CPG-SM.

Résultats

On ne trouve que des traces d'acides aminés (tableau III-14, figures III-73 et III-74). Afin de les quantifier, nous avons dû utiliser le mode « Mass Range » (MR) du logiciel Xcalibur : un filtre est appliqué, ne montrant sur le chromatogramme que les pics correspondant aux substances comportant le rapport m/z choisi. Ce rapport choisi est le pic majoritaire du spectre de masse de l'acide aminé recherché. Afin de pouvoir comparer les résultats de cette expérience avec la référence, nous avons également quantifié la référence en mode MR.

Il est intéressant de noter que le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol est le plus élevé de toutes les expériences réalisées au cours de cette partie (*cf.* tableau III-16), et donc plus élevé que le ratio qui nous avait permis de détecter les acides aminés malgré le fait que le sol ne soit pas chauffé au préalable (expérience 2). De plus, lorsque 10 µL de la solution d'acides aminés était évaporée (*cf.* expériences sur l'hydrolyse, chapitre II), les acides aminés étaient détectés à des ratios beaucoup plus importants. Pour 5,56 µL, nous aurions dû en détecter dans ce cas sans avoir besoin d'utiliser le mode MR. Il semble donc que malgré l'importance du ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol, les acides aminés aient été en trop faible quantité pour permettre un rendement de fonctionnalisation satisfaisant. En effet, une trop forte quantité d'eau non-structurelle dans le sol pourrait entraîner une réaction beaucoup plus rapide du MTBSTFA avec l'eau, par rapport à la réaction du MTBSTFA avec les acides aminés, n'aboutissant ainsi qu'à une faible quantité d'acides aminés fonctionnalisés.

Alternativement, la quantité d'acides aminés fonctionnalisés injectée peut avoir été inférieure à la limite de détection de l'appareil.

Ainsi, avec un ratio MTBSTFA:DMF similaire à celui utilisé par SAM, une concentration en acides aminés optimiste par rapport à ce qui est attendu sur Mars, et un ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol ayant auparavant permis de s'affranchir du pré-traitement du sol par chauffage ; la détection d'acides aminés semble compromise, mais ne serait pas impossible, puisque nous avons pu détecter des traces. Ceci renforce l'intérêt de l'incorporation d'une étape de pré-traitement par chauffage du sol dans les futurs instruments d'analyse d'acides aminés du régolithe martien, afin d'en éliminer toute eau qui pourrait désactiver le MTBSTFA et empêcher la détection d'acides aminés à l'état de traces. Peut-être serait-il également intéressant d'incorporer une étape de pré-concentration dans ces futurs instruments.

Il serait intéressant d'analyser Rio Tinto seul pour voir si on y trouve également des acides aminés, afin d'être certain que nos résultats ne puissent pas s'expliquer de cette façon. En effet, Stockton *et al.* (2009) ont détecté dans cet échantillon des acides aminés à des concentrations de l'ordre du ppt (sérine et glycine) et de l'ordre du ppb (valine, alanine et acide aspartique).

Il serait également intéressant de reprendre ce protocole en chauffant Rio Tinto après le dopage, pour voir si cela permet de détecter les acides aminés en plus grandes quantités.

Acide aminé	Référence		Rio Tinto dopé, SAM-like			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	0,16	4,06	4,41E-04	18,04	0,27	0,05
Glycine	0,09	5,18	2,03E-04	15,00	0,23	0,04
Valine	0,24	4,63	8,12E-04	17,90	0,34	0,06
Leucine	0,30	3,08	2,03E-03	14,61	0,68	0,10
Isoleucine	0,30	3,91	1,44E-03	16,31	0,48	0,08
Proline	0,34	3,07	3,81E-04	2,77	0,11	0,00
Méthionine	0,13	1,18	7,29E-05	93,57	0,06	0,05
Sérine	0,09	2,58	1,07E-05	173,21	0,01	0,02
Thréonine	0,13	1,77	2,62E-05	173,21	0,02	0,04
Phénylalanine	0,13	3,61	5,48E-05	173,21	0,04	0,07
Acide aspartique	0,09	0,36	0,00	N/A	0,00	0,00
Acide glutamique	0,06	4,64	0,00	N/A	0,00	0,00
Lysine	0,02	5,72	0,00	N/A	0,00	0,00
Histidine	0,08	14,09	0,00	N/A	0,00	0,00
Tyrosine	0,32	4,21	0,00	N/A	0,00	0,00
Cystine	0,02	7,94	0,00	N/A	0,00	0,00

Tableau III-14 : Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol de Rio Tinto, dopé avec une quantité d'acides aminés optimiste attendue sur Mars.

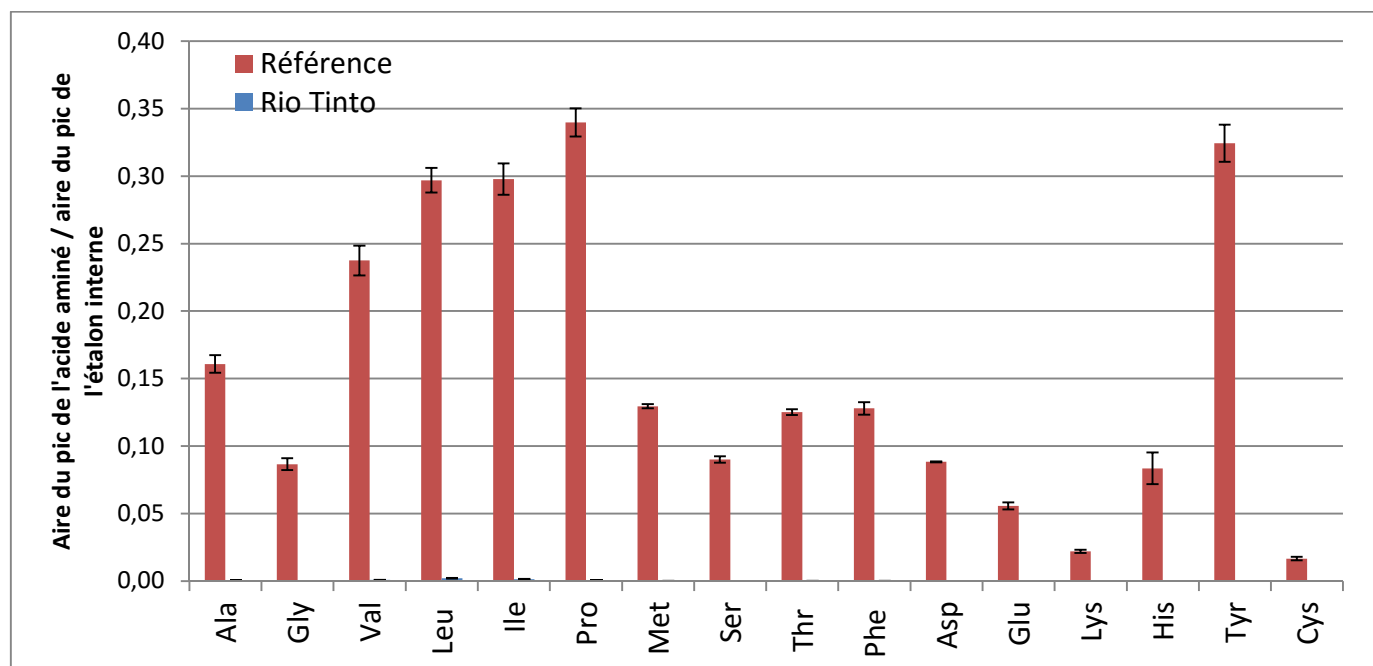


Figure III-73: Quantité des acides aminés pour la référence et l'échantillon dopé avec une quantité d'acides aminés optimiste attendue sur Mars.

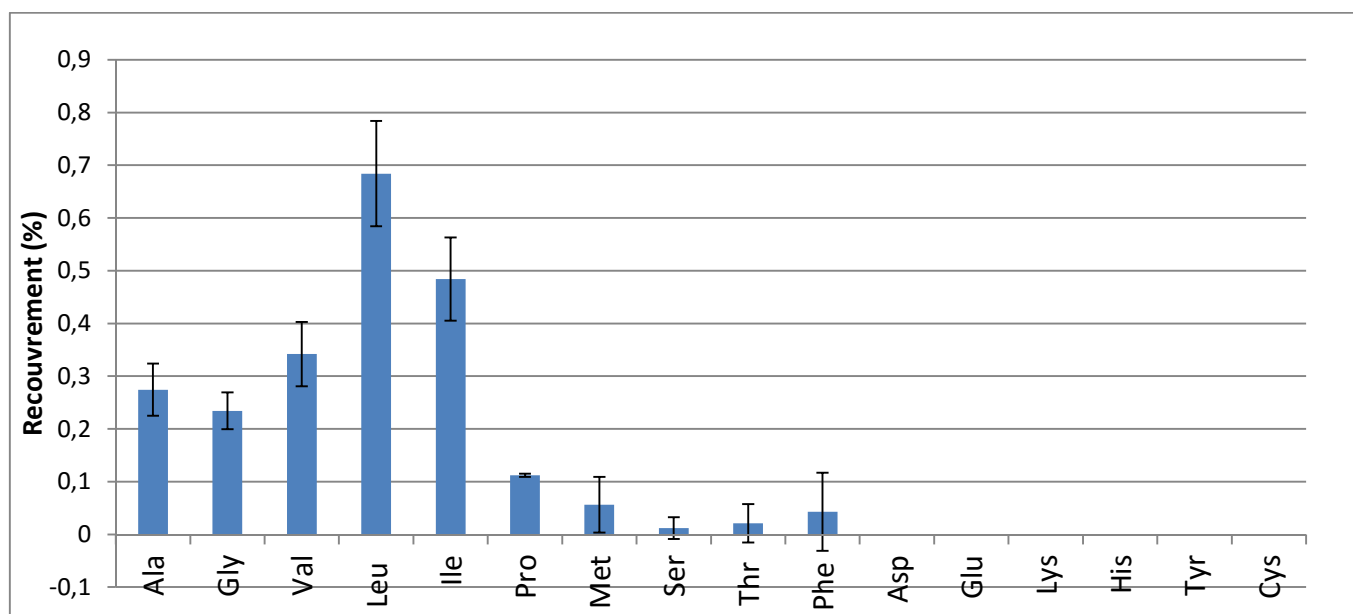


Figure III-74: Pourcentages de recouvrement des acides aminés, par comparaison entre la référence et l'expérience

3.5.2.2.2) Expérience 5 (sol non chauffé, ratio MTBSTFA / sol augmenté)

Hypothèse

Nous avons voulu ici réaliser la fonctionnalisation d'acides aminés directement dans le sol de Rio Tinto. Pour pouvoir comparer cette expérience avec les expériences dans lesquelles le sol est non dopé, nous avons utilisé les mêmes quantités d'acides aminés, de réactifs et de sol. Nous avons utilisé le même ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol que celui qui nous avait permis de détecter les acides aminés malgré le fait que le sol n'ait pas été chauffé au préalable (expérience 2).

Protocole

Nous avons dopé 10 mg de Rio Tinto avec un volume de 100 μ L de la solution d'acides aminés, selon le protocole de dopage utilisé lors de l'expérience 4. Le sol est ensuite fonctionnalisé (75°C, 15 min) avec un mélange pur de MTBSTFA/DMF (60 et 20 μ L,

respectivement, donc un volume total de réactif de 80 μ L, correspondant à un ratio DMF : MTBSTFA de 1 : 3) Ensuite, le fonctionnalisat est injecté pour analyse par CPG-SM.

Résultats

Les acides aminés sont bien détectés (tableau III-15, figure III-75). Cependant, ils le sont en moins grande quantité que dans l'expérience correspondant à l'hypothèse 3 (figure III-76). Pour le même ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol, la quantité d'acides aminés fonctionnalisés est moins grande lorsque Rio Tinto est dopé, que lorsque le MTBSTFA/DMF pur est chauffé (75°C, 15 minutes) en présence du sol puis prélevé pour réaliser la fonctionnalisation des acides aminés. Pourtant, le volume de réactif utilisé pour la fonctionnalisation est le même (80 μ L), avec le même ratio DMF : MTBSTFA (1 : 3).

Acide aminé	Référence		Rio Tinto dopé			
	Aire AA / Aire EI	ETR	Aire AA / Aire EI	ETR	Pourc. recouv.	ET
Alanine	1,16	2,77	0,59	24,55	51,28	12,59
Glycine	0,89	3,77	0,40	28,23	44,44	12,55
Valine	1,37	2,56	0,89	16,66	65,23	10,87
Leucine	1,46	0,89	0,93	25,59	63,83	16,33
Isoleucine	1,56	2,88	0,98	24,87	62,69	15,59
Proline	1,30	1,63	0,76	21,25	58,27	12,38
Methionine	1,35	1,45	0,68	22,78	50,40	11,48
Sérine	1,45	1,88	0,57	23,50	38,89	9,14
Thréonine	1,60	1,19	0,59	21,25	36,79	7,82
Phénylalanine	1,48	2,46	0,81	22,08	54,40	12,01
Acide aspartique	1,56	2,96	0,53	16,64	33,63	5,60
Acide glutamique	1,07	4,24	0,23	15,66	21,96	3,44
Lysine	0,64	2,14	0,00	N/A	0,00	N/A
Histidine	0,47	13,55	0,00	N/A	0,00	N/A
Tyrosine	1,56	4,55	0,28	18,71	18,00	3,37
Cystine	0,37	8,86	0,00	N/A	0,00	N/A

Tableau III-15: Aire du pic de l'acide aminé (AA) sur l'aire du pic de l'étalon interne (EI), et écart type relatif (ETR) (en %), pour la référence et l'expérience sur le sol de Rio Tinto, dopé.

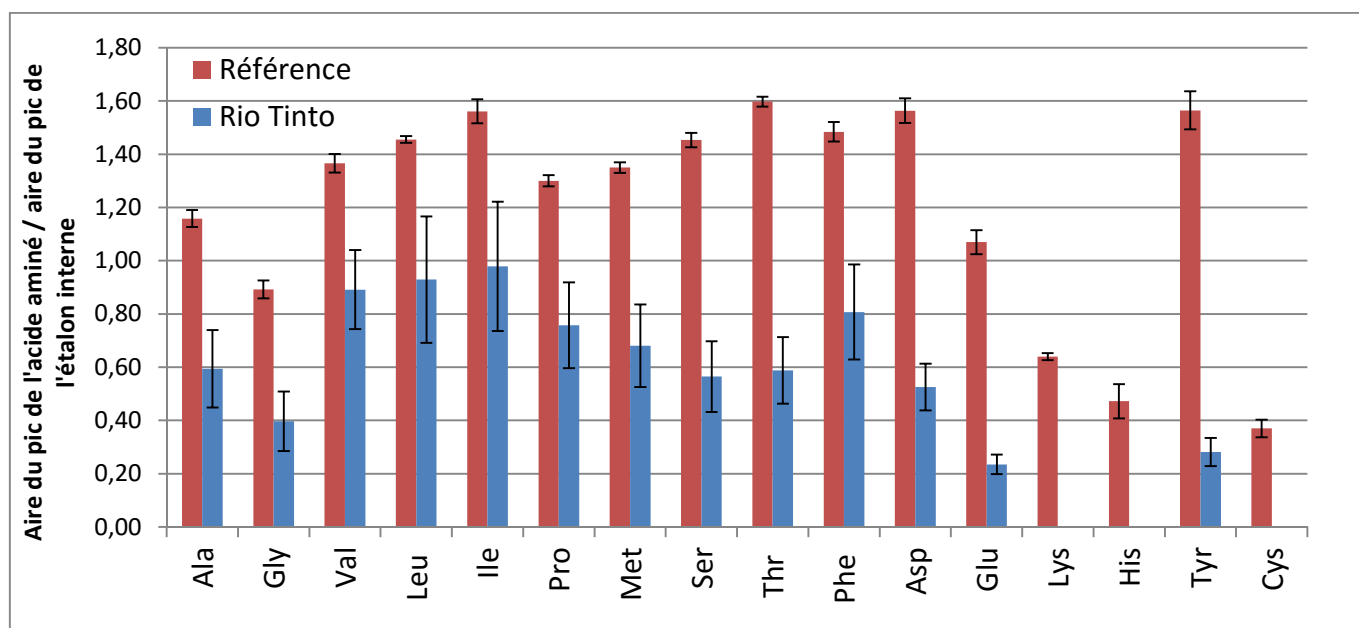


Figure III-75: Quantité des acides aminés pour la référence et l'échantillon dopé

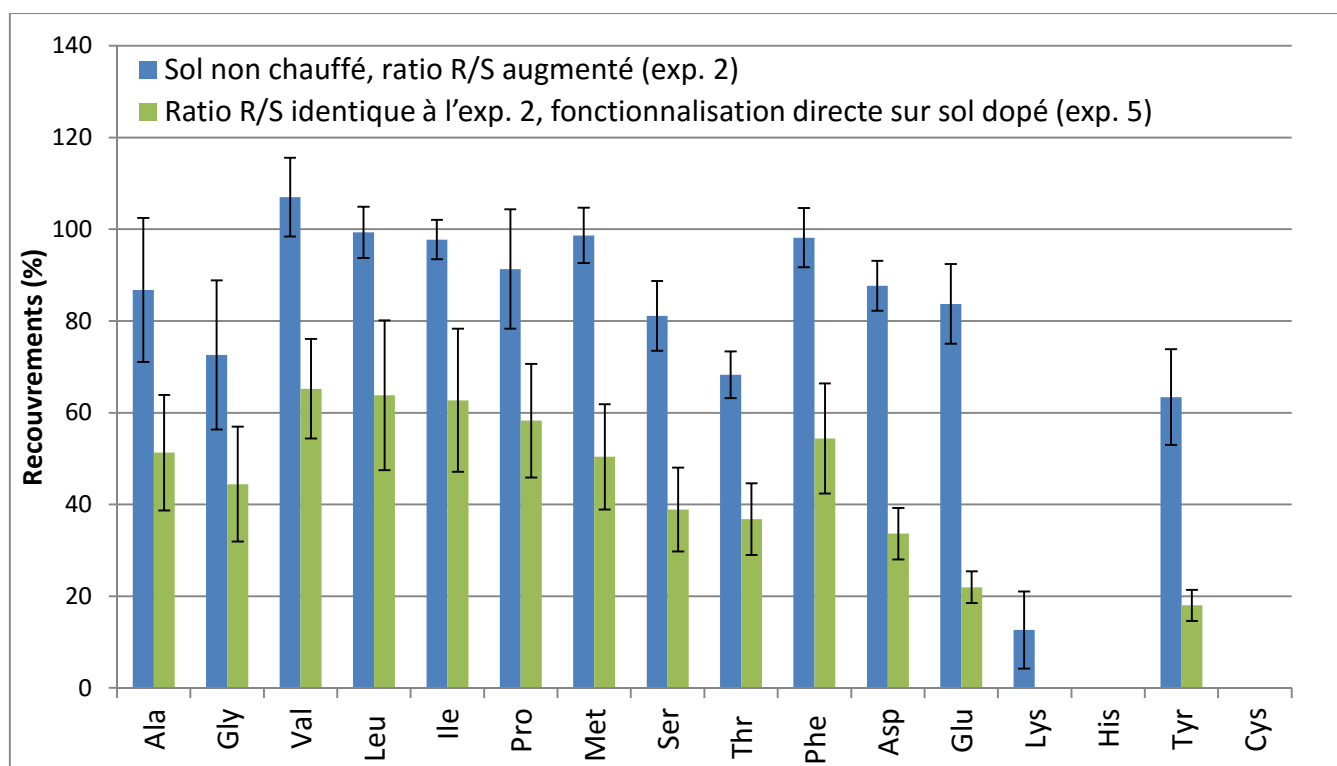


Figure III-76: Pourcentages de recouvrement des acides aminés, par comparaison entre la référence et l'expérience (expérience 2 contre expérience 5) (R/S : ratio quantité de réactif (MTBSTFA) / quantité de sol).

Dans cette expérience 5 (par comparaison avec l'expérience 2 ; les expériences 2 et 5 ayant en commun le fait que le sol n'a pas été chauffé), un nouveau facteur influençant

potentiellement les résultats entre en jeu : en plus de la famille de facteurs (i) (c'est-à-dire la désactivation chimique du MTBSTFA au cours du chauffage en présence du sol), nous avons cette fois-ci un effet potentiel de la famille de facteurs (ii), c'est-à-dire l'interaction entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles et / ou leurs produits de fonctionnalisation (molécules organiques cibles fonctionnalisées).

Nous pouvons donc suspecter qu'un des effets de la famille (ii) a pris place, conduisant à un recouvrement moindre que dans l'expérience 2. Puisque l'on peut éliminer le facteur de la non-disponibilité des acides aminés pour la fonctionnalisation, par liaison entre le H acide des molécules organiques cibles et l'atome de silicium du sol (il semble peu probable que le protocole de dopage permette la mise en place de telles liaisons) ; ainsi que l'oxydation des acides aminés et/ou acides aminés fonctionnalisés, l'échantillon de Rio Tinto ne contenant pas d'agents oxydants (puisque'il est uniquement constitué de sulfates hydratés, *cf. Stalport et al.*, 2012 ; à moins que nous ne considérions l'amarantite comme possédant également la qualité d'oxyde de fer, suivant l'écriture de sa formule, *cf. interprétation des résultats de l'expérience 1, paragraphe 3.5.2.1.1*), cela nous laisse comme possibilités :

(i) l'hydrolyse des acides aminés et/ou des acides aminés fonctionnalisés, causée par l'eau non-structurale présente dans le sol,

(ii) l'absorption des acides aminés fonctionnalisés par des sels, en l'occurrence, les sulfates (l'interférence physique des sels, *cf. Buch et al.*, 2006).

Alternativement, les recouvrements inférieurs de l'expérience 5 par rapport à l'expérience 3 pourraient être liés au fait que lors de la fonctionnalisation directe des acides aminés dans le sol, des espèces (comme l'eau) présentes en solution dans le DMF entrent en compétition avec les acides aminés pour la fonctionnalisation, entraînant ainsi un rendement de fonctionnalisation des acides aminés réduit. En effet, lorsque la fonctionnalisation a lieu en présence d'eau, la concentration en eau étant supérieure à la concentration en acides aminés, la réaction entre l'eau et le MTBSTFA se fait plus rapidement que celle entre les acides aminés et le MTBSTFA, aboutissant à un rendement de fonctionnalisation des acides aminés plus faible.

3.5.2.2.3) Conclusion

Les expériences sur sol dopé nous ont permis de montrer que dans le cas du sol dopé avec une quantité optimiste d'acides aminés attendue sur Mars, et un ratio DMF : MTBSTFA similaire à celui utilisé sur SAM, les acides aminés étaient détectés sous forme de traces (si ces traces ne proviennent pas de Rio Tinto lui-même). En outre, la fonctionnalisation sur sol dopé (expérience 5) semble donner des rendements inférieurs que lorsque le mélange MTBSTFA/DMF est chauffé en présence du sol, puis qu'une partie du réactif est utilisé pour fonctionnaliser la même quantité d'acides aminés (expérience 2). En plus d'un effet direct sur le MTBSTFA, la matrice minérale semble donc aussi avoir un effet sur les acides aminés et/ou les acides aminés fonctionnalisés, au cours de la réaction de fonctionnalisation en présence de l'échantillon de sol, par exemple par hydrolyse de ces derniers (présence d'eau non-structurale), ou par leur absorption par les sulfates.

3.5.3) Tableau récapitulatif et conclusions

		Ratio DMF : MTBSTFA	Masse sol (mg)	Volume solution AAs (μL)	Vol. DMF (μL)	Vol. MTBSTFA (μL)	Volume total réactif (μL)	Volume utilisé pour fonctionnalisation (μL)	Ratio "qté MTBSTFA / qté sol"	Exp.	Acides aminés détectés?
	Référence			100	20	60	80	80			
Rio Tinto non dopé	Non chauffé	1:3	25	100	40	120	160	80	3,2	0	Non
	Chauffé (10 mn; 150°C)	1:3	25	100	40	120	160	80	3,2	1	Oui
	Non chauffé	1:3	10	100	30	90	120	80	8	2	Oui
	Chauffé (15 mn; 75°C)	1:3	25	100	40	120	160	80	3,2	3	Oui
	SAM	1:4	<500 (e.g.: 200; 50)	?	100	400	500	500	>1 (e.g.: 2,5; 10)		
Rio Tinto dopé	"Mars-like"	1:4	10	5,56	30	120	150	150	15	4	Traces
	"Exp. 2 -like"	1:3	10	100	20	60	80	80	8	5	Oui

Tableau III-16: tableau récapitulatif de l'ensemble des expériences réalisées dans ce chapitre, concernant l'échantillon de sol de Rio Tinto

Les hypothèses avancées au cours de cette partie 3.5 étaient les suivantes:

Expériences sur sol non dopé :

Expérience 0 : la nature minéralogique de l'échantillon de sol de Rio Tinto possède une influence sur le rendement de la réaction de fonctionnalisation, et cette influence provient d'une désactivation chimique du MTBSTFA causée par la nature de la matrice minérale.

Expérience 1 : la présence importante d'eau non-structurale dans le sol de Rio Tinto est le facteur responsable de la non-détection des acides aminés.

Expérience 2 : en augmentant le ratio de la quantité de MTBSTFA par rapport à la quantité de sol, sans chauffage préalable du sol, la détection des acides aminés devient possible.

Expérience 3 : l'eau non-structurale de type eau de porosité / eau adsorbée / eau de solvation est l'eau responsable de la non-détection des acides aminés lors de l'expérience 0.

Expériences sur sol dopé :

Expérience 4 : une quantité optimiste d'acides aminés attendue sur Mars peut être détectée suite à une fonctionnalisation en présence de la matrice minérale, avec un ratio DMF : MTBSTFA similaire à celui utilisé par SAM, et un ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol supérieur à celui qui avait permis la détection des acides aminés sans chauffage préalable du sol (expérience 2).

Expérience 5 : la détection des acides aminés grâce à une fonctionnalisation directe des acides aminés dans leur matrice minérale est possible sans chauffage préalable du sol, si le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol est le même que lors de l'expérience 2.

Les résultats et conclusions obtenus par expérimentation sont les suivants:

Expériences sur sol non dopé :

Expérience 0 : Lorsque le mélange MTBSTFA / DMF est chauffé en présence du sol de Rio Tinto avant d'être utilisé pour fonctionnaliser des acides aminés, les acides aminés ne sont pas détectés. La nature minéralogique de l'échantillon de sol de Rio Tinto possède donc en effet une influence sur le rendement de la réaction de fonctionnalisation, et cette influence provient d'une désactivation chimique du MTBSTFA par la nature de la matrice minérale.

Expérience 1 : Cependant, lorsque le sol est préalablement chauffé à 150°C pendant 10 minutes, et que la même expérience est réitérée, les acides aminés sont détectés. Ainsi, la présence importante d'eau non-structurale dans le sol de Rio Tinto est probablement le

facteur principal responsable de la non-détection des acides aminés. Cependant, le rendement de la fonctionnalisation n'est pas de 100% pour tous les acides aminés. Nous pouvons invoquer plusieurs explications possibles pour expliquer ce résultat. Premièrement, le chauffage réalisé pourrait ne pas avoir suffi à éliminer la totalité de l'eau non-structurale de type porosité / adsorption / solvation de l'échantillon. Deuxièmement, le MTBSTFA pourrait réagir avec l'eau de cristallisation ($n\text{H}_2\text{O}$) des minéraux. Dans ce cas, soit elle est capable de réagir avec le MTBSTFA lors de l'étape de fonctionnalisation des acides aminés, alors qu'elle fait toujours partie de la structure des sulfates ; soit la réaction se fait lorsque l'eau est libérée pendant la fonctionnalisation, sous l'effet du chauffage à 75°C (cependant, ce dernier cas est peu probable, puisqu'il faudrait que cette eau libérée à 75°C n'ait pas été totalement éliminée par le pré-chauffage à 150°C pendant 10 minutes). Il peut également exister d'autres facteurs influant sur la fonctionnalisation des acides aminés. Ces facteurs pourraient être par exemple la réaction du MTBSTFA avec l'eau structurale (OH) des sulfates, si, de la même manière que pour l'eau de cristallisation, le MTBSTFA peut réagir avec les groupements hydroxyles des minéraux alors qu'ils sont inclus dans la structure des minéraux.

Expérience 2 : Lorsque le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol est augmenté, même sans chauffage préalable du sol, les acides aminés sont bien détectés. L'inhibition de la fonctionnalisation peut également être évitée en augmentant le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol. Cependant, cette méthode est moins efficace que le chauffage préalable du sol pendant 10 minutes à 150°C. En outre, cette méthode présente également le risque potentiel d'empêcher la détection de certaines molécules organiques, par un effet dilution. En effet, un volume élevé de solution pourrait résulter en une concentration en acides aminés trop faible pour permettre leur détection.

Expérience 3 : En chauffant au préalable à 75°C pendant 15 minutes, on détecte toujours les acides aminés. Nous pouvons donc affirmer que l'eau non-structurale de type porosité / adsorbée / solvation est en grande partie responsable de la non-détection des acides aminés.

Cependant, le recouvrement obtenu lors de l'expérience 1 est plus élevé que lors de l'expérience 3. Cela peut s'expliquer par le fait que lors de l'expérience 1, une plus grande quantité d'eau non-structurale de type eau de porosité / eau adsorbée / eau de solvation est éliminée, et/ou que lors de l'expérience 1, le chauffage à 150°C permet également d'éliminer de l'eau non-structurale de type $n(\text{H}_2\text{O})$ (eau de cristallisation des sulfates,

notamment celle de l'amarantite, qui commence à être libérée à 78°C, *cf. Frost et al., 2013*). Cela impliquerait que ce type d'eau est également responsable d'une diminution du rendement de la fonctionnalisation, même dans les conditions de chauffage du MTBSTFA en présence du sol (75°C pendant 15 minutes). Comme expliqué ci-dessus, il faudrait pour cela qu'elle soit capable de réagir avec le MTBSTFA malgré le fait qu'elle fasse partie de la structure du minéral ; ou bien que les conditions de chauffage du MTBSTFA en présence du sol (75°C pendant 15 minutes) permettent quand même de commencer à libérer de l'eau de cristallisation des sulfates, qui réagirait avec le MTBSTFA. Ce serait notamment possiblement le cas pour l'amarantite (première perte d'eau de cristallisation à 78°C, *cf. Frost et al., 2013*), si cette dernière n'a pas été totalement éliminée par le pré-chauffage à 75°C pendant 15 minutes. Un dernier facteur responsable des recouvrements inférieurs de l'expérience 3 par rapport à l'expérience 1 pourrait être la désactivation plus importante, lors de l'expérience 3, du MTBSTFA par les groupements hydroxyle présents dans la structure des sulfates, notamment de la jarosite, puisque les conditions de chauffage de l'expérience 1 (150°C pendant 10 minutes) pourraient permettre de déshydroxyler ce minéral (première déshydroxylation à 130°C ; *cf. Frost et al., 2005*), contrairement aux conditions de chauffage de l'expérience 3 (75°C pendant 15 minutes).

Expériences sur sol dopé :

Expérience 4 : Les acides aminés sont détectés sous forme de traces. Ce résultat montre qu'une quantité minimale d'acides aminés est nécessaire afin de pouvoir les détecter, même si le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol est favorable à leur détection. La détection d'acides aminés sur Mars aux conditions auxquelles nous avons réalisé l'expérience semble compromise (d'autant plus que le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol utilisé sur Mars sera inférieur à celui que nous avons utilisé ici), mais ne serait pas impossible, puisqu'on a pu détecter des traces.

Expérience 5 : Les acides aminés sont bien détectés lorsque Rio Tinto est dopé avec un volume de 100 µL d'acides aminés ; et avec un ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol qui avait permis la détection des acides aminés même lorsque le sol n'avait pas été chauffé (conditions de l'expérience 2).

Résumé :

Ainsi, la non-détection des acides aminés (causée par la désactivation chimique du MTBSTFA lors de son chauffage en présence du sol) peut être évitée en chauffant le sol au préalable, ou en augmentant la quantité de réactif par rapport à la quantité de sol. Il semble que ce soit principalement l'eau non-structurale de type eau de porosité / eau adsorbée / eau de solvation contenue dans Rio Tinto qui provoque la non-détection des acides aminés (avec une possible contribution de l'eau non-structurale de type eau de cristallisation contenue dans les sulfates, notamment l'amarantite).

Nous avons également montré qu'il est possible de réaliser une fonctionnalisation directement sur le sol en utilisant un ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol adéquat.

Cependant, quantitativement, les différentes solutions proposées (chauffage du sol, et augmentation du ratio quantité de réactif / quantité de sol) ne sont pas équivalentes en terme de recouvrement des acides aminés par rapport à la référence, et donc en termes de rendement de fonctionnalisation (figure III-77).

En effet, premièrement, le fait de ne pas chauffer le sol mais d'augmenter le ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol (expérience 2) ne permet pas de détecter tous les acides aminés (l'histidine et la cystine ne sont plus détectées), et le rendement de fonctionnalisation est réduit pour certains (lysine, tyrosine), par rapport à l'expérience 1. Cela pourrait s'expliquer par le fait que malgré l'augmentation du ratio quantité de MTBSTFA / quantité de sol, le ratio quantité de MTBSTFA / quantité d'eau soit plus important dans l'expérience 1 que dans l'expérience 2 (puisque nous n'avons pas évaporé l'eau dans cette dernière).

Deuxièmement, le fait de chauffer le sol à 75°C pendant 15 minutes (expérience 3) entraîne une diminution du rendement pour la lysine et une non-détection de l'histidine et de la cystine, par rapport à l'expérience n°1. Ceci pourrait être dû au fait que moins d'eau non-structurale de type porosité / adsorption / solvation est éliminée que lors du pré-traitement par chauffage à 150°C pendant 10 minutes. Alternativement, d'autres facteurs pourraient entrer en jeu, tels que la désactivation du MTBSTFA par l'eau de cristallisation ou l'eau structurelle des sulfates (une plus grande quantité de ces deux types d'eau étant éliminée lors du pré-chauffage de l'expérience 1).

Finalement, le fait de fonctionnaliser directement les acides aminés sur un sol dopé (expérience 5), avec les mêmes conditions d'expérience qui ont permis de détecter les acides aminés sans chauffer le sol (expérience 2), entraîne une diminution du rendement de tous les

acides aminés, et une non-détection de la lysine de l'histidine et de la cystine. Ceci pourrait être dû à un effet de la matrice sur les acides aminés et leurs produits de fonctionnalisation, au cours de la réaction de fonctionnalisation (effet destructif par hydrolyse, ou absorption des acides aminés fonctionnalisés par les sels). Ou bien, cela pourrait être lié au fait que lors de la fonctionnalisation directe des acides aminés dans le sol, des espèces (par exemple l'eau) présentes en solution dans le DMF entrent en compétition avec les acides aminés pour la fonctionnalisation, entraînant ainsi un rendement de fonctionnalisation des acides aminés réduit. En effet, lorsque la fonctionnalisation a lieu en présence d'eau, la concentration en eau étant supérieure à la concentration en acides aminés, la réaction entre l'eau et le MTBSTFA se fait plus rapidement que celle entre les acides aminés et le MTBSTFA, aboutissant à un rendement de fonctionnalisation des acides aminés plus faible.

Pourquoi la lysine, l'histidine et la cystine sont-ils non-détectés par certains traitements ? Les acides aminés basiques sont connus pour être les plus difficiles à fonctionnaliser, ce seront donc les plus sensibles à une baisse du rendement de la fonctionnalisation. La cystine est éluee en fin de programmation et sera donc plus difficile à détecter en cas de réduction du rendement de fonctionnalisation car elle pourra être dissimulée par le « bleed » de la colonne, et également à cause de la réduction de hauteur et l'augmentation de la largeur de son pic chromatographique.

La solution la plus efficace reste donc de pré-traiter le sol par chauffage à 150°C pendant 10 minutes (figure III-77). Cette technique permet, par rapport à la référence, d'obtenir un recouvrement proche de 100% pour tous les acides aminés, sauf les plus difficiles à fonctionnaliser. Le rendement plus élevé de cette technique pourrait provenir non seulement d'une évaporation plus importante de l'eau non structurée de porosité / adsorbée / solvatation, mais également de commencer à déshydrater les sulfates hydratés (élimination de l'eau de cristallisation $n(\text{H}_2\text{O})$), notamment pour l'amarantite, voire de commencer à les déshydroxyler, notamment pour la jarosite (élimination de l'eau structurée, autrement dit les groupements hydroxyle OH).

Cependant, un chauffage préalable du sol à 150°C présente le risque de vaporiser certaines molécules cibles d'intérêt exobiologique, qui ne seraient ainsi pas détectés par notre méthode d'analyse (par exemple, l'acide acétique, qui possède une température d'ébullition de 117,9°C [Haynes, 2013]). La méthode d'augmentation du ratio quantité de MTBSTFA sur

quantité de sol pourrait quant à elle causer la non-détection de certaines molécules organiques, par un effet dilution.

Pour la suite, on pourrait également considérer de nouvelles expériences qui feraient varier le ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol, en réalisant un gradient, afin de pouvoir déterminer à partir de quel ratio on peut commencer à détecter les acides aminés dans le sol, sans avoir recours à un pré-traitement du sol par chauffage. Pour information, une analyse préliminaire d'un seul réplicat (Rio Tinto dopé, avec un ratio quantité de MTBSTFA sur quantité de sol égal à 3,2) ne permet pas de détecter les acides aminés en TIC, cependant nous avons pu y détecter l'alanine en mode MR ($m/z = 158$ u).

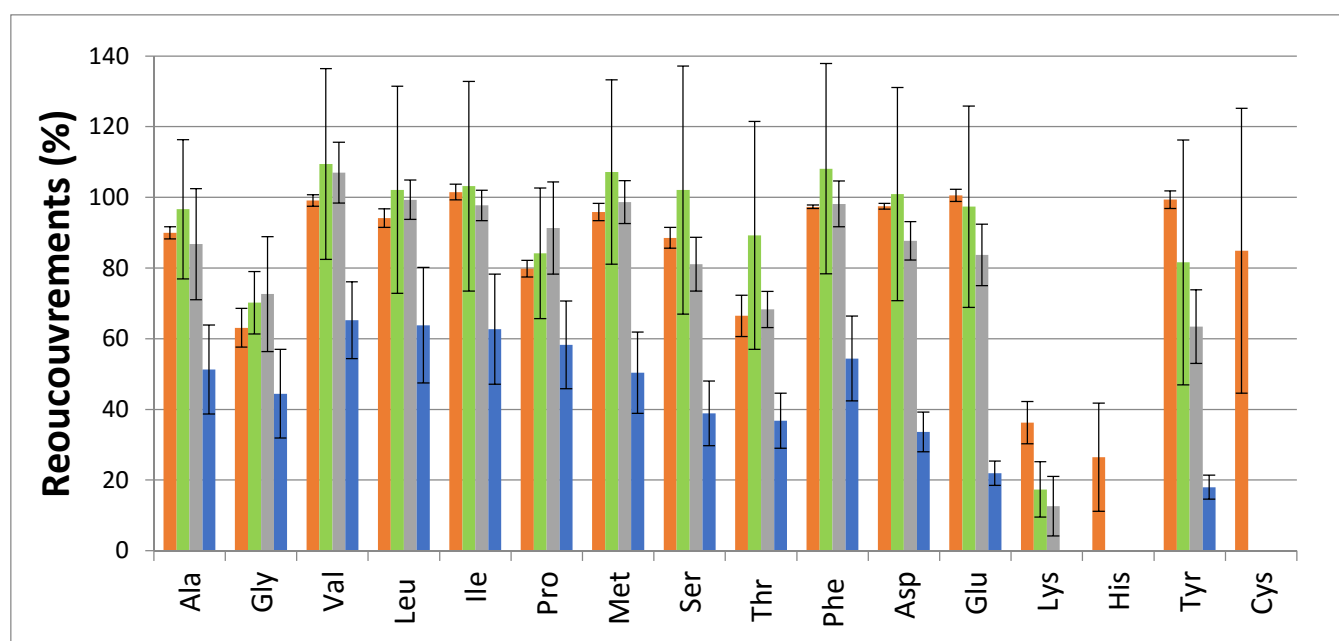


Figure III-77: comparaison des différents recouvrements au cours des expériences réalisées dans cette partie 3.5 (R/S : ratio quantité de réactif (MTBSTFA) / quantité de sol):

1) Réactif contacté avec Rio Tinto puis utilisé pour fonctionnaliser les acides aminés:

- Chauffage préalable du sol, 10 min, 150°C; R/S = 3,2
- Chauffage préalable du sol, 15 min, 75°C; R/S = 3,2
- Pas de chauffage préalable; R/S = 8

2) Réactif pur utilisé pour fonctionnaliser directement les acides aminés dans la matrice minérale:

- Pas de chauffage préalable; R/S = 8

3.6) Limites de l'étude

La limite de l'expérience réalisée en partie 1 de ce chapitre III (chauffage du réactif de fonctionnalisation en présence d'un échantillon d'analogue martien, puis utilisation de ce réactif pour fonctionnaliser une quantité connue d'acides aminés) est qu'elle ne permet potentiellement pas d'éliminer avec certitude la totalité des interactions de type (ii) (c'est-à-dire l'interaction entre la matrice minérale et les molécules organiques cibles / molécules organiques cibles fonctionnalisées), car des agents responsables d'une réduction de rendement (*e.g.* agents oxydants, sels) pourraient être extraits du sol lors de son étape de chauffage en présence du mélange MTBSTFA / DMF, présents en solution lorsque ce mélange est prélevé, et par conséquent être présents lors de la réaction de fonctionnalisation subséquente des acides aminés grâce à ce mélange. En conséquence, on ne peut pas éliminer avec certitude la totalité des facteurs discutés dans le point (ii). Cependant, même si cette hypothèse s'avère fondée, nous nous affranchissons toujours avec certitude d'un facteur de la famille (ii) : la liaison des molécules organiques aux atomes de silice du sol.

3.7) Conclusion

Ces expériences sont intéressantes dans le cadre des futures missions de recherche d'acides aminés dans les environnements extraterrestres, telles que MOMA, puisque le régolithe martien, dont les sites d'intérêt exobiologique, comporte des sulfates hydratés. En effet, les sulfates font partie des minéraux présents sur les sites d'intérêt pour la recherche de molécules organiques sur Mars, incluant le cratère gale (site d'atterrissage de MSL). Les futurs problèmes liés à la fonctionnalisation au MTBSTFA pourraient être évités grâce à la continuation de ces tests au laboratoire. Ce travail pourrait peut-être avoir une application dans le cadre de SAM, car nous avons découvert que le pré-traitement par chauffage du sol n'était pas indispensable (ce type de pré-traitement n'est pas possible sur SAM), mais qu'on pouvait réduire la masse de sol et réussir à détecter les acides aminés ainsi. Peut-être que la masse de sol apportée aux capsules de fonctionnalisation pourrait être modifiée pour arriver à un ratio volume de réactif / masse de sol permettant la détection des acides aminés malgré la désactivation du MTBSTFA par la minéralogie du sol. Ainsi, on pourrait peut-être trouver un

« trade-off », un ratio qui permette d'éviter que tout le MTBSTFA réagisse avec de l'eau (si le sol contient de l'eau) mais avec assez de sol pour que les acides aminés soient en assez grande quantité pour être détectés (puisque l'on a vu que pour une quantité trop faible d'acides aminés sur sol dopé, ils n'étaient pas détectés).

Finalement, les sols contenant des phyllosilicates et des carbonates (Svalbard), et la nature du sol d'Atacama (sol analogue reconnu pour sa nature oxydante) ne semblent pas poser de problèmes vis-à-vis de la fonctionnalisation au MTBSTFA. Cela semble être un bon signe pour la recherche de molécules organiques sur Mars.

3.8) Références

- Allen, D.K., Ratcliffe, R.G., 2009. Quantification of Isotope Label, in: Schwender, J. (Ed.), *Plant Metabolic Networks*. Springer New York, pp. 105–149.
- August, C., 1991. The determination of hydrated sulphates in the weathered crystalline rocks by means of thermal analysis, in: Smykatz-Kloss, P.W., Warne, P.S.S.J. (Eds.), *Thermal Analysis in the Geosciences, Lecture Notes in Earth Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 102–114.
- Bai, G.H., Xu, P., Li, P.C., Wang, T.S., 2010. Thermal Dehydration Kinetic Mechanism of Aluminum Sulfate Hydrates. *Adv. Mater. Res.* 177, 238–244.
doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.177.238
- Benner, S.A., Devine, K.G., Matveeva, L.N., Powell, D.H., 2000. The missing organic molecules on Mars. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2425–2430. doi:10.1073/pnas.040539497
- Brown, M.E. (Ed.), 2004. *Evolved Gas Analysis (EGA)*, in: *Introduction to Thermal Analysis, Hot Topics in Thermal Analysis and Calorimetry*. Springer Netherlands, pp. 139–155.
- Buch, A., Glavin, D., Sternberg, R., Szopa, C., Rodier, C., Navarro-González, R., Raulin, F., Cabane, M., Mahaffy, P., 2006. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry. *Planet. Space Sci.* 54, 1592–1599.
- Buch, A., Sternberg, R., Meunier, D., Rodier, C., Laurent, C., Raulin, F., Vidal-Madjar, C., 2003. Solvent extraction of organic molecules of exobiological interest for in situ analysis of the Martian soil. *J. Chromatogr. A* 999, 165–174. doi:10.1016/S0021-9673(03)00494-1
- Buch, A., Sternberg, R., Szopa, C., Freissinet, C., Garnier, C., Bekri, E.J., Rodier, C., Navarro-González, R., Raulin, F., Cabane, M., others, 2009. Development of a gas chromatography compatible Sample Processing System (SPS) for the in-situ analysis of refractory organic matter in martian soil: preliminary results. *Adv. Space Res.* 43, 143–151.
- Coats, A.W., Redfern, J.P., 1963. Thermogravimetric analysis. A review. *Analyst* 88, 906–924. doi:10.1039/AN9638800906

- Dunn, J. g., 2002. Thermogravimetric Analysis, in: Characterization of Materials. John Wiley & Sons, Inc.
- Dunn, M.S., Brophy, T.W., 1932. Decomposition Points of the Amino Acids. *J. Biol. Chem.* 99, 221–229.
- Eigenbrode, J.L., Bower, H., Archer, P.J., 2014. Decarboxylation of Carbon Compounds as a Potential Source for CO₂ and CO Observed by SAM at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars.
- Felix, N., Girgis, B., 1989. Isothermal and nonisothermal gravimetry of nontronite dehydroxylation. *J. Therm. Anal. Calorim.* 35, 743–750. doi:10.1007/BF02057229
- Freissinet, C., 2010. Recherche de traces de vie extraterrestre : élaboration d'une unité d'extraction et d'analyse chirale pour la séparation énantiomérique in situ de molécules organiques d'intérêt exobiologique. Ecole Centrale Paris.
- Frost, R.L., López, A., Scholz, R., Xi, Y., da Silveira, A.J., Lima, R.M.F., 2013. Characterization of the sulphate mineral amarantite – using infrared, Raman spectroscopy and thermogravimetry. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 114, 85–91. doi:10.1016/j.saa.2013.04.111
- Frost, R.L., Vassallo, A.M., 1996. The dehydroxylation of the kaolinite clay minerals using infrared emission spectroscopy. *Clays Clay Miner.* 44, 635–651.
- Frost, R.L., Wain, D.L., Wills, R.-A., Musemeci, A., Martens, W., 2006. A thermogravimetric study of the alunites of sodium, potassium and ammonium. *Thermochim. Acta* 443, 56–61.
- Frost, R.L., Weier, M.L., Martens, W., 2005. Thermal decomposition of jarosites of potassium, sodium and lead. *J. Therm. Anal. Calorim.* 82, 115–118. doi:10.1007/s10973-005-0850-z
- Fujine, K., 2014. FlashEA 1112 Elemental Analyzer (CHNS) User Guide. Int. Ocean Discov. Program.
- Gunasekaran, S., Anbalagan, G., 2007. Thermal decomposition of natural dolomite. *Bull. Mater. Sci.* 30, 339–344.
- Haynes, W.M. (ed.), 2013. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 94th Edition. CRC Press LLC Boca Raton FL 2013-2014 p. 3–4.
- Höhne, G., Hemminger, W., Flammersheim, H.-J., 2003. Differential Scanning Calorimetry. Springer Science & Business Media.
- Karathanasis, A.D., 2008. Thermal Analysis of Soil Minerals, in: Methods of Soil Analysis: Mineralogical Methods. Part 5. Soil Science Society of America, pp. 117–160.
- Leshin, L.A., Mahaffy, P.R., Webster, C.R., Cabane, M., Coll, P., Conrad, P.G., Archer, P.D., Atreya, S.K., Brunner, A.E., Buch, A., Eigenbrode, J.L., Flesch, G.J., Franz, H.B., Freissinet, C., Glavin, D.P., McAdam, A.C., Miller, K.E., Ming, D.W., Morris, R.V., Navarro-González, R., Niles, P.B., Owen, T., Pepin, R.O., Squyres, S., Steele, A., Stern, J.C., Summons, R.E., Sumner, D.Y., Sutter, B., Szopa, C., Teinturier, S., Trainer, M.G., Wray, J.J., Grotzinger, J.P., MSL Science Team, 2013. Volatile, Isotope, and Organic Analysis of Martian Fines with the Mars Curiosity Rover. *Science* 341, 1238937. doi:10.1126/science.1238937
- Martín-Torres, F.J., Zorzano, M.-P., Valentín-Serrano, P., Harri, A.-M., Genzer, M., Kemppinen, O., Rivera-Valentin, E.G., Jun, I., Wray, J., Bo Madsen, M., Goetz, W., McEwen, A.S., Hardgrove, C., Renno, N., Chevrier, V.F., Mischna, M., Navarro-González, R., Martínez-Frías, J., Conrad, P., McConnochie, T., Cockell, C., Berger, G., R.

- Vasavada, A., Sumner, D., Vaniman, D., 2015. Transient liquid water and water activity at Gale crater on Mars. *Nat. Geosci.* 8, 357–361. doi:10.1038/ngeo2412
- Mawhinney, T.P., Robinett, R.S.R., Atalay, A., Madson, M.A., 1986. Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas—liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 358, 231–242. doi:10.1016/S0021-9673(01)90333-4
- Ming, D.W., Archer, P.D., Glavin, D.P., Eigenbrode, J.L., Franz, H.B., Sutter, B., Brunner, A.E., Stern, J.C., Freissinet, C., McAdam, A.C., Mahaffy, P.R., Cabane, M., Coll, P., Campbell, J.L., Atreya, S.K., Niles, P.B., Bell III, J.F., Bish, D.L., Brinckerhoff, W.B., Buch, A., Conrad, P.G., Des Marais, D.J., Ehlmann, B.L., Fairén, A.G., Farley, K., Flesch, G.J., Francois, P., Gellert, R., Grant, J.A., Grotzinger, J.P., Gupta, S., Herkenhoff, K.E., Hurowitz, J.A., Leshin, L.A., Lewis, K.W., McLennan, S.M., Miller, K.E., Moersch, J., Morris, R.V., Navarro-González, R., Pavlov, A.A., Perrett, G.M., Pradler, I., Squyres, S.W., Summons, R.E., Steele, A., Stolper, E.M., Sumner, D.Y., Szopa, C., Teinturier, S., Trainer, M.G., Treiman, A.H., Vaniman, D.T., Vasavada, A.R., Webster, C.R., Wray, J.J., Yingst, R.A., MSL Science Team, 2014. Volatile and Organic Compositions of Sedimentary Rocks in Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. *Science* 343, 1245267. doi:10.1126/science.1245267
- Molony, B., Ridge, M.J., 1968. Kinetics of the dehydration of calcium sulphate dihydrate in vacuo. *Aust. J. Chem.* 21, 1063–1065.
- Nagase, K., Sato, K., Tanaka, N., 1975. Thermal dehydration and decomposition reactions of bivalent metal oxalates in the solid state. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 439–442.
- Navarro-González, R., Navarro, K.F., Rosa, J. de la, Iñiguez, E., Molina, P., Miranda, L.D., Morales, P., Cienfuegos, E., Coll, P., Raulin, F., Amils, R., McKay, C.P., 2006. The limitations on organic detection in Mars-like soils by thermal volatilization—gas chromatography—MS and their implications for the Viking results. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16089–16094. doi:10.1073/pnas.0604210103
- Neves, H.J.C.D., Vasconcelos, A.M.P., 1987. Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic—mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic—mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr. A* 392, 249–258. doi:10.1016/S0021-9673(01)94270-0
- Newman, E.S., 1941. Behavior of calcium sulfate at high temperatures. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* 27, 191. doi:10.6028/jres.027.009
- Öhlund, J., Näsholm, T., 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiol.* 21, 1319–1326. doi:10.1093/treephys/21.18.1319
- Ostroff, A.G., 1964. Conversion of gypsum to anhydrite in aqueous salt solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 28, 1363–1372. doi:10.1016/0016-7037(64)90154-1
- Pelovski, Y., Petkova, V., 1999. Investigation on Thermal Decomposition of Pyrite Part I. *J. Therm. Anal. Calorim.* 56, 95–99. doi:10.1023/A:1010135425009
- Punmia, D.B.C., Jain, A.K., 2005. *Soil Mechanics and Foundations*. Firewall Media.
- Quinn, R.C., Zent, A.P., Grunthaner, F.J., Ehrenfreund, P., Taylor, C.L., Garry, J.R.C., 2005. Detection and characterization of oxidizing acids in the Atacama Desert using the Mars Oxidation Instrument. *Planet. Space Sci.* 53, 1376–1388. doi:10.1016/j.pss.2005.07.004
- Rodier, C., Sternberg, R., Raulin, F., Vidal-Madjar, C., 2001. Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 915, 199–207. doi:10.1016/S0021-9673(01)00625-2

- Silvestri, Z., 2013. mrzac/sac2mat [WWW Document]. GitHub. URL <https://github.com/mrzac/sac2mat> (accessed 3.17.15).
- Smith, P.H., Tamppari, L.K., Arvidson, R.E., Bass, D., Blaney, D., Boynton, W.V., Carswell, A., Catling, D.C., Clark, B.C., Duck, T., DeJong, E., Fisher, D., Goetz, W., Gunnlaugsson, H.P., Hecht, M.H., Hipkin, V., Hoffman, J., Hviid, S.F., Keller, H.U., Kounaves, S.P., Lange, C.F., Lemmon, M.T., Madsen, M.B., Markiewicz, W.J., Marshall, J., McKay, C.P., Mellon, M.T., Ming, D.W., Morris, R.V., Pike, W.T., Renno, N., Staufer, U., Stoker, C., Taylor, P., Whiteway, J.A., Zent, A.P., 2009. H₂O at the Phoenix Landing Site. *Science* 325, 58–61. doi:10.1126/science.1172339
- Squyres, S.W., Grotzinger, J.P., Arvidson, R.E., Bell, J.F., Calvin, W., Christensen, P.R., Clark, B.C., Crisp, J.A., Farrand, W.H., Herkenhoff, K.E., Johnson, J.R., Klingelhöfer, G., Knoll, A.H., McLennan, S.M., McSween, H.Y., Morris, R.V., Rice, J.W., Rieder, R., Soderblom, L.A., 2004. In Situ Evidence for an Ancient Aqueous Environment at Meridiani Planum, Mars. *Science* 306, 1709–1714. doi:10.1126/science.1104559
- Stalport, F., Glavin, D.P., Eigenbrode, J.L., Bish, D., Blake, D., Coll, P., Szopa, C., Buch, A., McAdam, A., Dworkin, J.P., Mahaffy, P.R., 2012. The influence of mineralogy on recovering organic acids from Mars analogue materials using the “one-pot” derivatization experiment on the Sample Analysis at Mars (SAM) instrument suite. *Planet. Space Sci.* 67, 1–13. doi:10.1016/j.pss.2012.02.010
- Stanjek, H., 2003. Hydroxides and oxyhydroxide minerals, in: *Sedimentology, Encyclopedia of Earth Science*. Springer Netherlands, pp. 592–595.
- Stockton, A.M., Chiesl, T.N., Lowenstein, T.K., Amashukeli, X., Grunthaner, F., Mathies, R.A., 2009. Capillary electrophoresis analysis of organic amines and amino acids in saline and acidic samples using the Mars organic analyzer. *Astrobiology* 9, 823–831. doi:10.1089/ast.2009.0357
- Vaniman, D.T., Bish, D.L., Ming, D.W., Bristow, T.F., Morris, R.V., Blake, D.F., Chipera, S.J., Morrison, S.M., Treiman, A.H., Rampe, E.B., Rice, M., Achilles, C.N., Grotzinger, J.P., McLennan, S.M., Williams, J., Bell III, J.F., Newsom, H.E., Downs, R.T., Maurice, S., Sarrazin, P., Yen, A.S., Morookian, J.M., Farmer, J.D., Stack, K., Milliken, R.E., Ehlmann, B.L., Sumner, D.Y., Berger, G., Crisp, J.A., Hurowitz, J.A., Anderson, R., Des Marais, D.J., Stolper, E.M., Edgett, K.S., Gupta, S., Spanovich, N., MSL Science Team, 2014. Mineralogy of a Mudstone at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. *Science* 343, 1243480. doi:10.1126/science.1243480
- Wang, Y., Francis, D.R., O’Brien, D.M., Wooller, M.J., 2008. A protocol for preparing subfossil chironomid head capsules (Diptera: Chironomidae) for stable isotope analysis in paleoclimate reconstruction and considerations of contamination sources. *J. Paleolimnol.* 40, 771–781. doi:10.1007/s10933-008-9197-3
- Wilson, M.J., 2013. *Rock-forming Minerals: Sheet silicates: clay minerals*. Volume 3C. Geological Society of London.
- Yablokov, V.Y., Smel'tsova, I.L., Zelyaev, I.A., Mitrofanova, S.V., 2009. Studies of the rates of thermal decomposition of glycine, alanine, and serine. *Russ. J. Gen. Chem.* 79, 1704–1706. doi:10.1134/S1070363209080209
- Yeskis, D., Groos, A.F.K. van, Guggenheim, S., 1985. The dehydroxylation of kaolinite. *Am. Mineral.* 70, 159–164.

Conclusion générale

Le premier chapitre de cette thèse a consisté en une étude bibliographique portant tout d'abord sur la recherche des indices d'une vie passée ou présente en dehors de la Terre. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la nature des indices à rechercher, puis aux lieux dans lesquels rechercher, et enfin les méthodes utilisées pour mener à bien ces recherches. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux problèmes potentiels rencontrés au cours de la recherche d'acides aminés dans deux matrices différentes : les météorites tombées sur Terre, et la surface de Mars. Ces problèmes, rencontrés lors d'analyses *in situ* (SAM, MOMA) ou au laboratoire, peuvent être de deux ordres : les pertes en acides aminés causées par le protocole d'hydrolyse acide visant à analyser ces derniers dans les météorites ; et l'interférence de la minéralogie de la matrice minérale martienne avec la fonctionnalisation au MTBSTFA.

Le deuxième chapitre a porté sur l'étude des pertes en acides aminés suite à l'hydrolyse acide au HCl 6M, et a mis en évidence une forte réduction des quantités d'acides aminés après ce protocole d'hydrolyse (que ce soit une hydrolyse traditionnelle avec chauffage pendant 24h à 100°C, ou un contact rapide à froid avec une solution de HCl 6M). Ces pertes pourraient s'expliquer par la dégradation des acides aminés lors de leur contact avec le HCl 6M, ou bien par la présence, suite à l'hydrolyse, de sels (et plus précisément, d'anions chlorure) interférant avec la fonctionnalisation des acides aminés en réagissant avec le MTBSTFA. Si tel est le cas, nous avons donc démontré l'intérêt d'une purification par échange de cations (protocole largement utilisé dans les études portant sur la recherche d'acides aminés météoritiques) précédemment à une réaction de silylation au MTBSTFA, et nous avons apporté des informations sur un des mécanismes possibles de la réduction du rendement de la fonctionnalisation au MTBSTFA.

Le troisième et dernier chapitre a porté sur l'influence de la minéralogie martienne sur le rendement de fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA. Notre travail a porté sur trois analogues martiens, provenant d'Atacama, Svalbard et Rio Tinto. La première étape a été de réaliser un test permettant de vérifier si le MTBSTFA était désactivé lors de son chauffage

en présence des différentes matrices minérales. Nous avons pour cela chauffé le MTBSTFA en présence du sol, avant d'en récupérer une partie pour fonctionnaliser une quantité connue d'acides aminés, et comparer les quantités d'acides aminés mesurées lors de cette expérience avec celles obtenues par fonctionnalisation de la même quantité d'acides aminés avec du MTBSTFA pur. Sur les trois analogues, seul l'échantillon de Rio Tinto, constitué de sulfates hydratés, a totalement empêché la détection des acides aminés.

Après caractérisation des sols par analyse thermique, afin d'identifier les étapes de pertes de masse et les espèces libérées correspondantes, il s'est avéré que la non-détection des acides aminés suite au chauffage du MTBSTFA en présence de l'échantillon de Rio Tinto pouvait être causée par la présence d'eau non-structurale (comprenant l'eau de porosité, l'eau d'adsorption et l'eau de solvation ; ainsi que l'eau de cristallisation des sulfates pour cet échantillon) en quantité importante dans cet échantillon.

Nous avons donc décidé de chauffer le sol à 150°C pendant 10 minutes en amont de son contact avec le MTBSTFA, afin d'en éliminer l'eau non-structurale, et avons pu ainsi identifier ce type d'eau comme étant l'espèce responsable de la non-détection des acides aminés au sein de cet échantillon, par réaction avec le MTBSTFA. Un pré-chauffage à 75°C pendant 15 minutes a également permis la détection des acides aminés, montrant que l'eau non-structurale de type porosité / adsorption / solvation (pouvant être qualifiée d'eau libre, par opposition à l'eau non-structurale de type eau de cristallisation) est la principale responsable de la désactivation du MTBSTFA (avec cependant une possible contribution de l'eau de cristallisation de l'amarantite, un des sulfates de l'échantillon de Rio Tinto, commençant à perdre son eau de cristallisation à 78°C). Nous avons ensuite augmenté le ratio quantité de réactif sur quantité de sol, sans l'étape de chauffage préalable du sol, et de cette manière, nous avons réussi à détecter des acides aminés malgré l'interférence causée par l'eau non-structurale présente dans le sol.

Nous avons également réalisé un deuxième type de test, en ajoutant cette fois les acides aminés à l'échantillon de sol (dopage) avant d'y ajouter le MTBSTFA et de chauffer pour réaliser la fonctionnalisation des acides aminés cette fois-ci directement dans la matrice minérale. Nous avons ainsi pu constater que le rendement de fonctionnalisation a été fortement affecté par l'eau non-structurale contenue dans l'échantillon de Rio Tinto, lors d'un test sur sol dopé consistant à simuler la fonctionnalisation par l'instrument SAM d'une quantité optimiste d'acides aminés contenue dans le sol martien, mais que la détection de

traces d'acides aminés était possible dans ces conditions. Finalement, toujours lors d'un test sur sol dopé, en utilisant le ratio quantité de réactif sur quantité de sol de l'expérience qui avait permis la détection des acides aminés sans chauffage préalable du sol, nous avons réussi à détecter les acides aminés, avec cependant des rendements de fonctionnalisation inférieurs à ceux obtenus lorsque le MTBSTFA était chauffé en présence du sol avant d'être récupéré pour fonctionnaliser les acides aminés. Ce résultat pourrait s'expliquer par une interaction entre la matrice minérale et les acides aminés et/ou les acides aminés fonctionnalisés, facteur venant s'ajouter à la désactivation du MTBSTFA par l'eau, mise en évidence plus avant ; ou bien par le fait que le rendement de fonctionnalisation des acides aminés est réduit lorsque la fonctionnalisation des acides aminés a lieu directement en présence de la matrice minérale, c'est-à-dire en présence d'eau (la réaction entre l'eau et le MTBSTFA se faisant plus rapidement que celle entre les acides aminés et le MTBSTFA, à cause de la concentration en eau supérieure à la concentration en acides aminés).

Ces résultats sont intéressants vis-à-vis de la recherche d'acides aminés à la surface de Mars (où de l'eau non-structurale a été détectée, notamment au sein de sulfates hydratés) par les missions MSL et ExoMars, et pourraient permettre de prévenir la non-détection des acides aminés grâce au développement de techniques incluant un pré-traitement par chauffage de l'échantillon avant fonctionnalisation, et/ou l'utilisation des ratio quantité de réactif sur quantité de sol adéquats.

Finalement, il semble que la constatation générale de cette thèse soit la sensibilité du rendement de la silylation au MTBSTFA (la silylation étant une réaction dont le mécanisme est considéré comme analogue à une substitution nucléophile de type 2) à tout autre nucléophile que les nucléophiles cibles, que ce soit par exposition à une matrice minérale contenant de l'eau, ou une solution de HCl, contenant des anions chlorures.

Annexe

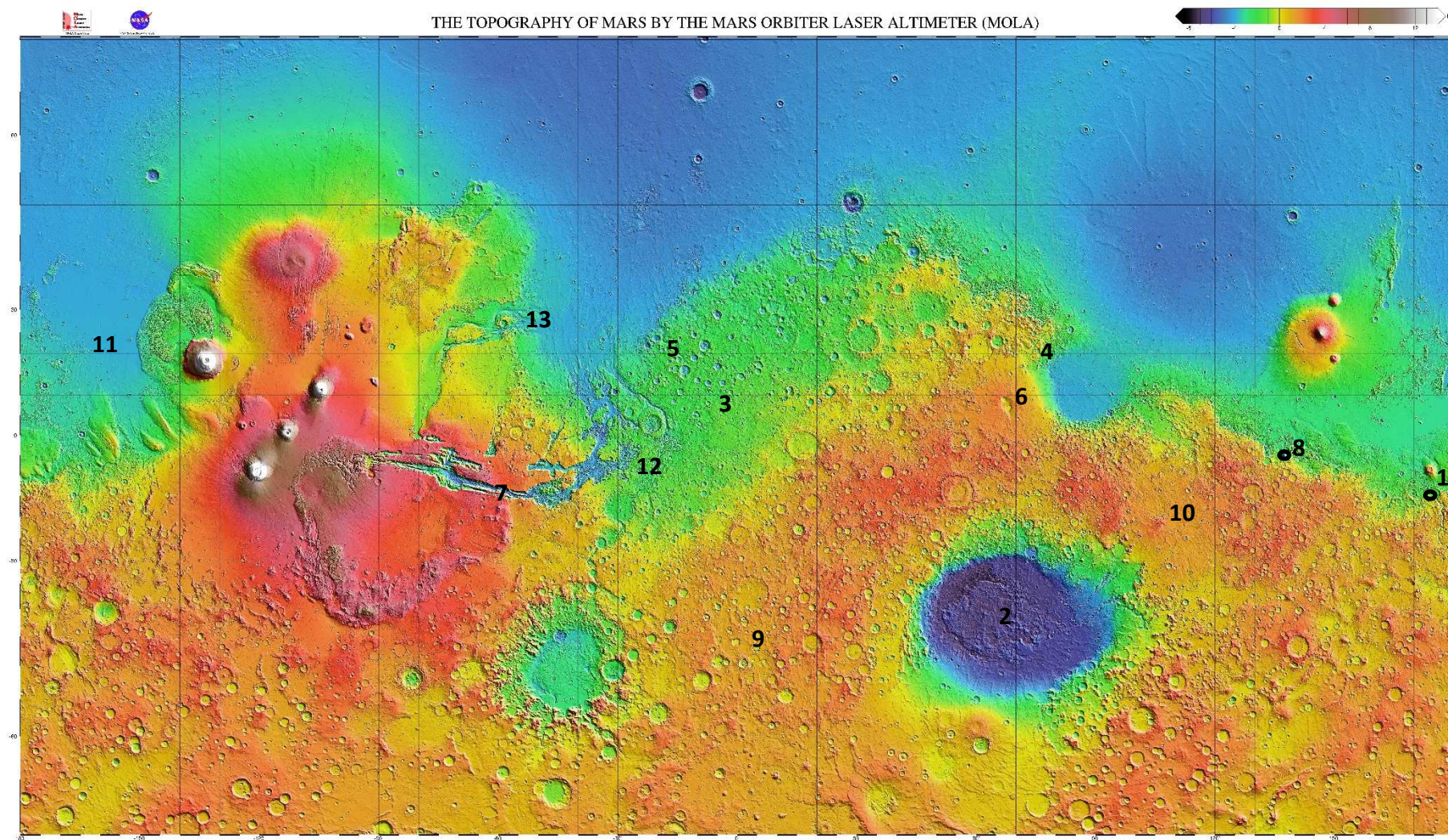


Figure 1 : Carte de Mars. 1 : Cratère Gusev (Site d'atterrissage de Spirit. Au sein du cratère se trouvent les Columbia Hills). 2 : Hellas Planitia. 3 : Terra Meridiani (au sein de laquelle se trouve Meridiani Planum, site d'atterrissage d'Opportunity. Le cratère Endeavour est localisé au sein de Meridiani Planum, et en son sein se trouve le site Matijevic Hill). 4 : Nili Fossae. 5 : Mawrth Vallis. 6 : Syrtis Major. 7 : Valles Marineris. 8 : Cratère Gale (site d'atterrissage de Curiosity. Au sein du cratère se trouve Yellowknife Bay). 9 : Noachis Terra. 10 : Hesperia Planum. 11 : Amazonis Planitia. 12 : Margaritifer Sinus. 13 : Kasei Vallis. 14 : Olympia Planitia.

Résumé :

Trois grandes voies d'étude permettent de rechercher la présence de traces de vie dans l'Univers : l'analyse à distance, l'analyse en laboratoire de prélèvements de matériel extraterrestre tombé ou ramené sur Terre, et l'analyse *in situ*. Associée à de la fonctionnalisation chimique, la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM) est la méthode de prédilection utilisée comme moyen de séparation et d'identification de composés organiques d'intérêt exobiologique, à la fois sur Terre et au-delà. Ce travail s'intéresse d'une part à l'impact de la préparation d'échantillon sur les rendements de récupération, après fonctionnalisation, des acides aminés, cibles privilégiées de la recherche de traces de vie extraterrestre. Nous avons en particulier étudié l'influence de l'hydrolyse acide, notamment utilisée lors de l'analyse des acides aminés météoritiques. Puis nous nous sommes intéressés à l'impact de la minéralogie sur le rendement de la fonctionnalisation des acides aminés au MTBSTFA.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une réduction des quantités d'acides aminés après hydrolyse au HCl 6M et fonctionnalisation au MTBSTFA. Cette diminution de rendement a été attribuée à une dégradation des acides aminés lors l'étape d'hydrolyse, ou plus probablement à la génération de sels de chlorure interagissant avec le MTBSTFA. Nous avons également mis en évidence l'impact négatif sur la fonctionnalisation d'une matrice constituée de sulfates hydratés (échantillon du sol de Rio Tinto). Après analyse thermique de l'échantillon et identification des étapes de pertes de masse et des espèces libérées correspondantes, nous avons décidé de chauffer le sol pour en éliminer l'eau libre. Nous avons mis en évidence que ce type d'eau était l'espèce principalement responsable de la non-détection des acides aminés au sein de nos échantillons. Nous avons également pu procéder à la détection des acides aminés sans étape de chauffage, en augmentant la quantité de MTBSTFA par rapport à la quantité de sol. Ces résultats sont d'importance pour les futures analyses à la surface de Mars (SAM, MOMA), et pourront permettre de mettre en place des protocoles adaptés.

Mots-clés : Mars, météorites, acides aminés, fonctionnalisation, MTBSTFA, minéralogie, hydrolyse acide, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse.

Abstract :

Three main ways of study allow us to search for traces of life in the Universe: remote analysis, laboratory analysis of extraterrestrial material fallen or brought back to Earth, and *in situ* analysis. In association with chemical derivatization, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) is the method of predilection used for the separation and identification of organic compounds of astrobiological interest, whether on Earth or beyond. This work firstly deals with the impact of sample preparation on the yield of recovery, after derivatization, of amino acids, privileged targets for the search for traces of extraterrestrial life. We have especially studied the influence of acid hydrolysis, notably used during the analysis of meteoritic amino acids. We have then dealt with the impact of mineralogy on the yield of amino acid derivatization with MTBSTFA.

Our results have allowed us to highlight a reduction of the amino acid quantities after 6M HCl hydrolysis and MTBSTFA derivatization. This yield reduction was attributed to a degradation of the amino acids during the hydrolysis step, or more likely to the generation of chloride salts interacting with MTBSTFA. We also have shown the negative impact on derivatization of a matrix composed of hydrated sulfates (Rio Tinto soil sample). After thermal analysis of the sample and identification of the mass loss steps and corresponding evolved species, we have decided to heat the soil in order to eliminate its free water. We have shown that this type of water was the main responsible for the non-detection of the amino acids amongst our samples. We also were able to detect amino acids without a heating step, by increasing the quantity of MTBSTFA relatively to the soil quantity. These results are of importance for future analyses on the surface of Mars (SAM, MOMA), and will enable the development of adapted protocols.

Key-words : Mars, meteorites, amino acids, derivatization, MTBSTFA, mineralogy, acid hydrolysis, gas chromatography, mass spectrometry.